



Maria Raquel Teodósio Pacheco

Licenciatura em Bioquímica

Desenvolvimento de Novos Biopolímeros Proteicos em Rede

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Prof. Doutora Maria Manuela Marques Araújo Pereira,
Professora Auxiliar, FCT NOVA

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira,
Professora Auxiliar, FCT NOVA
Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares,
Professor Auxiliar, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço
Arguente: Prof. Doutora Maria Manuel Martinho Sequeira Barata Marques
Vogal: Prof. Doutora Maria Manuela Marques Araújo Pereira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2019

Desenvolvimento de Novos Biopolímeros Proteicos em Rede
Maria Pacheco



Maria Raquel Teodósio Pacheco

Licenciatura em Bioquímica

Desenvolvimento de Novos Biopolímeros Proteicos em Rede

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Prof. Doutora Maria Manuela Marques Araújo Pereira, Professora Auxiliar,
FCT NOVA

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira, Professora Auxiliar, FCT NOVA
Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares, Professor Auxiliar, FCT
NOVA

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Caparica, Março de 2019

Desenvolvimento de Novos Biopolímeros Proteicos em Rede

Copyright © Maria Raquel Teodósio Pacheco, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dissertação redigida conforme o Acordo Ortográfico de 1945, aprovado pelo Decreto n.º 35.228, de 8 de Dezembro.

*As with most chemical reactions, they appear deceptively simple at first glance,
but upon digging deeper we find quite a bit of complexity.*
(Eric V. Anslyn, Dennis A. Dougherty)

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Manuela Pereira, Professora Alice Pereira e Professor Pedro Tavares, um enorme obrigada por me terem aceite como sua orientanda, por tudo o que me possibilitaram aprender ao longo destes anos e por toda a paciência e compreensão que a construção deste documento envolveu.

Aos meus colegas de laboratório, Cristina Timóteo, Daniela Penas, Nídia Almeida, Ana Almeida e ao João Guerra, pela ajuda no laboratório, aprendizagem, troca de conhecimentos e discussão de ideias. Ao João Jacinto, não só pelo referido, mas também pelo trabalho em equipa, amizade e preocupação.

À Jessica Machado, ao Diogo Gonçalves e ao Luís Ferreira, pela ajuda na análise dos dados das espectroscopias de RMN e IV e na quantificação densitométrica em imagens digitais dos géis SDS-PAGE e PAGE.

Ao Davide Mendes, pelo incentivo e motivação para enveredar nesta “aventura”.

Ao Elói Martins, pelas opiniões dadas ao longo deste trabalho.

Aos meus pais e aos meus avós, por tudo o que me proporcionaram ao longo da minha vida que me permitiu chegar até aqui e ser quem sou.

Ao meu irmão, pela sua maturidade, pelo seu apoio e preocupação; pela companhia nas longas noites e pelo seu sentido de humor.

À Ana Margarida Afonso e à Ana Margarida Pereira, por me continuarem a aturar ao longo dos anos, por serem meus braços direitos e meus portos de abrigo nas alturas mais duras e complicadas, por todas as gargalhadas e disparates. Por sempre acreditarem em mim, mesmo quando nem eu própria acreditei.

À Catarina Ezequiel e ao João Fragoso, por todos os desabafos e refúgio.

À Cátia Lopes, pela sua amizade e por ser a melhor companheira de casa que se podia pedir.

Ao Paulo Magalhães, pela sua presença.

A todos aqueles que, de alguma forma, me acompanharam ao longo desta jornada, um muitíssimo obrigada!

Resumo

O presente trabalho teve como objectivos principais a preparação e caracterização de estruturas proteicas supramoleculares artificiais, do tipo rede, a partir da proteína mutante DpsT10C da gaiola proteica Dps de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, utilizando reacções de química de clique.

Para tal, testaram-se, primeiramente, as reacções no aminoácido L-cisteína ou em seus derivados, permitindo os resultados obtidos inferir que a metodologia utilizada poderia ser aplicada num sistema mais complexo como o da proteína DpsT10C.

Após expressão e purificação da proteína mutante DpsT10C, esta foi modificada quimicamente com os reagentes alquilantes 3-bromoprop-1-eno, 4-bromobut-1-eno e 3-bromoprop-1-ino nos seus resíduos de L-cisteína, em condições reaccionais suaves. Por fim, acoplaram-se as moléculas de proteína DpsT10C original com as de proteína DpsT10C funcionalizadas, ou com o espaçador 1,2-bis(aliloxi)etano, através dos acoplamentos tiol-eno e tiol-ino, utilizando o fotoiniciador LAP. A formação de estruturas supramoleculares artificiais foi confirmada por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes e por AFM em meio líquido. As estruturas supramoleculares foram caracterizadas cineticamente e por espectroscopia de CD.

As análises realizadas revelaram que a estrutura secundária das moléculas de proteína nas estruturas formadas não sofreu alteração com a adição das cadeias alquílicas nem com o estabelecimento das ligações cruzadas. Relativamente à morfologia e dimensões das estruturas supramoleculares obtidas, as moléculas de DpsT10C dispõem-se em fibras longas, em alguns casos agrupadas em colónias com aparência semelhante a um coral, que chegam a atingir micrómetros em tamanho. Todas as proteínas funcionalizadas e todas as estruturas supramoleculares analisadas mantiveram a capacidade de ferroxidação e mineralização de ferro, aparentando a estrutura formada com 1,2-bis(aliloxi)etano possuir uma capacidade catalítica mais eficiente ou formar espécies férricas distintas.

Termos-chave: química de clique, acoplamento tiol-eno, LAP, gaiolas proteicas, Dps, estruturas proteicas supramoleculares artificiais

Abstract

The aim of the present study consisted in the preparation, using click chemistry reactions, and characterization of artificial supramolecular protein structures (protein network) using DpsT10C, a mutant protein of the protein nanocage Dps from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Reactions were initially tested using the amino acid L-cysteine or its derivatives. The initial results allowed the application of the methodology in a more complex system.

After expression and purification, DpsT10C mutant protein was chemically modified with the alkylating agents 3-bromoprop-1-ene, 4-bromobut-1-ene and 3-bromoprop-1-yne in its L-cysteine residues, under mild reaction conditions. At last, the original DpsT10C protein molecules were coupled to the functionalized DpsT10C protein molecules or to the 1,2-bis(allyloxy)ethane linker through the thiol-ene and thiol-yne couplings using the LAP photoinitiator. The formation of artificial supramolecular structures was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and non-denaturing conditions and by AFM in liquid medium. The supramolecular structures were characterized kinetically and by CD spectroscopy.

The data showed that the secondary structure of the protein molecules in the artificial structures was kept after addition of the alkyl chains and formation of the cross-links. Regarding the morphology and dimensions of the obtained supramolecular structures, the molecules of DpsT10C are organized in long fibres, in some cases assembled in clusters like a coral, that reach micrometres in size. All of functionalized proteins and supramolecular structures maintained the iron ferroxidation and mineralization capacity. The structure formed with 1,2-bis(allyloxy)ethane apparently displayed a more efficient catalytic capacity or formed distinct ferric species.

Keywords: click chemistry, thiol-ene coupling, LAP, protein nanocages, Dps, artificial supramolecular protein structures

Índice de conteúdos

1. Introdução	1
1.1. Modificação de proteínas	1
1.1.2. Métodos metabólicos e genéticos	2
1.1.2. Química de clique	5
1.1.2.1. Cicloadição	5
1.1.2.2. Substituição nucleofílica (em átomos de carbonos saturados)	8
1.1.2.3. Química do grupo carbonilo	9
1.1.2.4. Adição a ligações múltiplas carbono-carbono	11
1.2. Gaiolas proteicas	16
1.2.1. Ferritinas	17
1.2.2. Aplicações biotecnológicas das proteínas da família das ferritinas	20
1.3. Estruturas proteicas supramoleculares artificiais	22
1.4. Objectivos	26
2. Parte experimental	27
2.1. Geral	27
2.1.1. Programas utilizados na representação das estruturas tridimensionais das proteínas e no cálculo de parâmetros proteicos	27
2.1.2. Reagentes, solventes e cromatografia em camada fina	27
2.1.3. Células de sobreexpressão, vectores de expressão, meios de cultura, antibióticos e marcadores de massas moleculares	27
2.1.4. Procedimentos bioquímicos	28
2.1.5. Reacções de irradiação	29
2.1.6. Análise de produtos	29
2.1.7. Quantificação de grupos sulfidrilo	30
2.2. Síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)	32
2.2.1. Método geral I	32
2.2.2. Método geral II	32
2.3. Síntese de <i>S</i> -(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a e 21b)	34
2.4. Acoplamento de L-cisteína (17) e <i>S</i> -(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a)	35
2.5. Transformação química de células competentes <i>E. coli</i> BL21(DE3)	36
2.6. Sobreexpressão e purificação de DpsT10C (23)	37
2.7. Preparação de DpsT10C (23) para as reacções	38

2.8. Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)	39
2.9. Acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24)	40
2.10. Caracterização de proteínas	42
2.10.1. Electroforese em gel de poliacrilamida	42
2.10.2. Determinação da actividade enzimática de oxidação de iões Fe^{2+} na presença de H_2O_2	42
2.10.3. MALDI-TOF MS	43
2.10.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	43
2.10.5. Dispersão dinâmica de luz (DLS)	44
2.10.6. Microscopia de força atómica (AFM)	44
3. Resultados e discussão	45
3.1. Síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)	45
3.2. Acoplamento de L-cisteína (17) e <i>S</i> -(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a)	49
3.3. Produção e purificação de DpsT10C (23)	53
3.4. Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)	56
3.5. Preparação de estruturas proteicas supramoleculares artificiais de DpsT10C (26a a 33)	58
3.6. Caracterização dos bioconjugados proteicos e dos produtos das reacções de acoplamento	62
3.6.1. Electroforese em gel de poliacrilamida	62
3.6.2. MALDI-TOF MS	71
3.6.3. Actividade de ferroxidação	73
3.6.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	76
3.6.5. Dispersão dinâmica de luz (DLS)	81
3.6.6. Microscopia de força atómica (AFM)	82
4. Conclusões e perspectivas futuras	89
5. Referências bibliográficas	91
Anexo I – Sistema de sobreexpressão	105
I.1. Genótipo das células de expressão <i>E. coli</i> BL21(DE3) (NZYTech)	105
I.2. Mapa do vector de expressão pET-21c(+) com o gene que codifica para a proteína DpsT10C	105
I.3. Sequência de aminoácidos da proteína mutante DpsT10C	105
Anexo II – Marcadores de massas moleculares para electroforese em gel de poliacrilamida	106
Anexo III – Electroforese em gel de poliacrilamida	107
Anexo IV – Montagem para as reacções de acoplamento	108

Anexo V – Quantificação densitométrica das bandas dos géis de SDS-PAGE	109
Anexo VI – Quantificação de grupos sulfidrilo	114
VI.1. Síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)	114
VI.1.1. Método I	114
VI.1.2. Método II	115
VI.2. Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)	116
VI.3. Acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24)	125
Anexo VII – Espectros de IV	137
VII.1. Material de partida das reacções de síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)	137
VII.2. Material de partida da reacção de síntese de <i>S</i> -(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a e 21b)	137
Anexo VIII – Espectros de UV-Vis	138

Índice de figuras

Figura 1.1 – Mecanismo geral das reacções de cicloadição [4 + 2].	5
Figura 1.2 – Estrutura química dos dipolos 1,3.	6
Figura 1.3 – Reacções 1,3-dipolares, aplicadas a proteínas.	6
Figura 1.4 – Reacções de hetero-Diels-Alder, aplicadas a proteínas.	7
Figura 1.5 – Mecanismo geral das reacções de substituição nucleofílica.	8
Figura 1.6 – Estrutura química dos heterocíclicos tensos epóxido, aziridina, sulfato cíclico, sulfamidato cíclico, ião aziridínio e ião epissulfónio.	8
Figura 1.7 – Reacções de substituição nucleofílica de abertura de um grupo epóxido e aziridina, aplicadas a proteínas.	9
Figura 1.8 – Estrutura química das funcionalidades éter de oxima e hidrazona.	9
Figura 1.9 – Reacções de formação de um grupo ureia, tioureia, éter de oxima, hidrazona e amida, aplicadas a proteínas.	11
Figura 1.10 – Esquema geral das reacções de adição a ligações múltiplas carbono-carbono.	12
Figura 1.11 – Reacção de aziridinação de um composto norborneno por uma sulfonilazida, aplicada à proteína tiorredoxina.	12
Figura 1.12 – Reacções de adição de hetero-Michael, aplicadas a proteínas.	14
Figura 1.13 – A) Estrutura química dos iniciadores radicalares LAP (2), 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (3), DPAP (4), 2-benzil-2-(dimetilamino)-1-[4-(4-morfolinil)fenil]-1-butanona (5), di-hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (6), di-hidrocloreto de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (7) e AIBN (8) utilizados nas reacções de acoplamento tiol-eno e tiol-ino. B) Acoplamento tiol-eno aplicado à proteína mCherry. C) Reacções sequenciais de acoplamentos tiol-ino e tiol-eno aplicadas à proteína BSA.	15
Figura 1.14 – Estrutura tridimensional das proteínas da família das ferritinas de <i>E. coli</i> , apresentadas segundo um dos eixos de rotação de ordem 2.	17
Figura 1.15 – Estrutura das subunidades das proteínas Ftn e Dps de <i>E. coli</i> , com destaque para os elementos de estrutura secundária (hélices α).	18
Figura 1.16 – Vista pelos canais das proteínas de <i>E. coli</i> da família das ferritinas.	19
Figura 1.17 – Imagens de microscopia electrónica de transmissão (TEM) do complexo supramolecular formado pela fusão do domínio C-terminal de gp5 à extremidade N-terminal da proteína Dps de <i>Listeria innocua</i> .	22

Figura 1.18 – Estrutura da gaiola proteica com 16 subunidades formada a partir da proteína recombinante Ftn humana de subunidades H.	22
Figura 1.19 – Estrutura do glutaraldeído (9).	23
Figura 1.20 – Redução dos iões Au(III) nos cristais de uma proteína mutante de Ftn de baço equino.	23
Figura 1.21 – Cristais binários formados por Ftn e nanopartículas de Au (estrutura cúbica simples), CCMV e nanopartículas de Au (estrutura cúbica de face centrada), CCMV e a glicoproteína avidina (estrutura cúbica de corpo centrado), CCMV e o dendrímero poli(amidoamina) com seis gerações (estrutura cúbica de face centrada).	23
Figura 1.22 – Imagem de TEM da estrutura com empacotamento hexagonal formada por CCMV e um dendrímero fotossensível.	24
Figura 1.23 – Representação esquemática da formação de géis de globulina de farelo de arroz, a valores de força iónica baixos e elevados.	24
Figura 1.24 – A) Representação esquemática do hidrogel formado pelos domínios de hélice superenrolada, com extensão das cadeias através de pontes dissulfureto. B) Estrutura dos compostos utilizados para a extensão das cadeias dos hidrogéis utilizando as reacções de acoplamento tiol-maleimida e tiol-eno.	25
Figura 1.25 – Estrutura dos compostos utilizados nas ligações cruzadas em proteínas semelhantes a elastina.	25
Figura 1.26 – Estrutura da proteína DpsT10C.	26
Figura 3.1 – Estrutura do composto (2R,2'R)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (22).	52
Figura 3.2 – Análise do perfil de produção proteica e fraccionamento celular por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%).	53
Figura 3.3 – Cromatograma do passo de purificação do sobrenadante da ultracentrifugação em coluna DEAE <i>Sepharose™ Fast Flow</i> , eluída com tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM), com um caudal de 5 mL/min, monitorizando a absorvância a 280 nm.	54
Figura 3.4 – Avaliação da eficiência do passo cromatográfico em coluna DEAE <i>Sepharose™ Fast Flow</i> por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%) para purificação da proteína DpsT10C.	54
Figura 3.5 – Espectros de UV-Vis das fracções globais I e II após concentração (Vivacell 70, 5 kDa MWCO) e da fracção global III, diluídas 1:100.	55
Figura 3.6 – Análise das fracções globais de proteína DpsT10C purificada por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%).	55

Figura 3.7 – Monitorização das reacções de funcionalização da proteína DpsT10C (**23**), 57 através da quantificação dos grupos sulfidrilo, com 3-bromoprop-1-eno (**18a**) (bioconjugados **24a** a **24c**), 4-bromobut-1-eno (**18b**) (proteínas funcionalizadas **24d** a **24f**) e 3-bromoprop-1-ino (**18c**) (proteínas **24g** e **24h**).

Figura 3.8 –Evolução temporal das reacções de acoplamento de DpsT10C (**23**) e de 60 proteína DpsT10C funcionalizada (**24**) em diferentes condições experimentais.

Figura 3.9 – Espectros de UV-Vis do meio reaccional de formação de **27b**, diluído 1:100, 61 antes da adição de LAP (**2**) e da irradiação a 365 nm e após 120 min de reacção.

Figura 3.10 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com 63 o reagente **18a** e do seu acoplamento com a proteína **23**.

Figura 3.11 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com 64 o reagente **18b** e do seu acoplamento com a proteína **23**.

Figura 3.12 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com 65 o reagente **18c** e do seu acoplamento com a proteína **23**.

Figura 3.13 – Análise electroforética do produto da reacção de acoplamento utilizando o 66 espaçador **25**.

Figura 3.14 – Análise electroforética dos produtos das reacções de acoplamento de 67 proteínas sem espaçador (**30** a **33**).

Figura 3.15 – Estrutura de DpsT10C (**23**) com os resíduos de fenilalanina-5, das várias 67 cadeias, assinalados a vermelho e com os resíduos de tirosina-82, -85, -151 e -154 identificados a cor-de-laranja.

Figura 3.16 – Espectros de MALDI-TOF MS, entre 5000 m/z e 20 000 m/z , da proteína 72 DpsT10C (**23**), da proteína funcionalizada **24c** e do produto da reacção de acoplamento de ambas (**26c**).

Figura 3.17 – Reacção de oxidação de Fe^{2+} , em tampão MOPS 50 mM pH = 7,0, 74 NaCl 50 mM, na presença de um excesso de H_2O_2 , em condições aeróbias, de DpsT10C (**23**), das proteínas funcionalizada **24c** e **24h** e dos produtos **26c**, **28** e **29** das reacções de acoplamento.

Figura 3.18 – Espectros de CD (entre 195 nm e 260 nm, a 20 °C) e de SRCD (entre 76 177 nm e 280 nm, a 25 °C) da proteína Dps, dos pélete dos produtos **29** e **33** (**29.P** e **33.P**, respectivamente) e dos produtos **30** e **31**.

Figura 3.19 – Análise da estabilidade térmica do produto **29** (pélete do produto de 78 acoplamento **29**, **29.P**) e do produto **30**, por espectroscopia de CD, entre 195 nm e 260 nm.

Figura 3.20 – Determinação dos valores das temperaturas de fusão (T_m) para o pélete do 80 produto **29** (**29.P**) e o produto **30**.

Figura 3.21 – Imagens de AFM da proteína DpsT10C (23).	82
Figura 3.22 – Imagens de AFM do produto 26c.	83
Figura 3.23 – Imagens de AFM do produto 27b.	84
Figura 3.24 – Imagens de AFM do produto 29.	85
Figura 3.25 – Imagens de AFM dos péletes dos produtos 29 (29.P) e 33 (33.P).	86
Figura I.1 – Mapa do vector de expressão pET-21c(+)-DpsT10C.	105
Figura II.1 – Marcadores de massas moleculares de proteínas utilizados ao longo do presente trabalho.	106
Figura IV.1 – Montagem utilizada nas reacções de acoplamento, com indicação do equipamento.	108
Figura VI.1 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.	114
Figura VI.2 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24a.	117
Figura VI.3 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24b.	118
Figura VI.4 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c.	119
Figura VI.5 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24d.	120
Figura VI.6 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24e.	121
Figura VI.7 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f.	122
Figura VI.8 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24g.	123
Figura VI.9 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h.	124
Figura VI.10 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento 26a.	126
Figura VI.11 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26b.	127
Figura VI.12 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26c.	128
Figura VI.13 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a.	129

Figura VI.14 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27b .	130
Figura VI.15 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c .	131
Figura VI.16 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28 .	132
Figura VI.17 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29 .	133
Figura VI.18 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento 30 e 33 .	134
Figura VI.19 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31 .	135
Figura VI.20 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 32 .	136
Figura VII.1 – Espectro de IV, entre 4000 cm ⁻¹ e 400 cm ⁻¹ , de <i>N</i> -acetil-L-cisteinato de etilo (19) com a indicação das bandas e as vibrações correspondentes.	137
Figura VII.2 – Espectro de IV, entre 4000 cm ⁻¹ e 400 cm ⁻¹ , de L-cisteína (17) com a indicação das bandas e as vibrações correspondentes.	137
Figura VIII.1 – Espectros de UV-Vis, entre 250 nm e 600 nm, dos bioconjugados de DpsT10C 24a a 24h diluídos entre 1:10 e 1:100.	138

Índice de esquemas

Esquema 3.1 – Síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo (20a) e compostos relacionados (20b a 20d) a partir de <i>N</i> -acetil-L-cisteinato de etilo (19).	45
Esquema 3.2 – Síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo (20a) e compostos relacionados (20b a 20d) através das reacções S_N1 , S_N2 , S_N2' e da reacção de oxidação.	46
Esquema 3.3 – Síntese de (2 <i>R</i> ,2' <i>R</i>)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (22) a partir de l-cisteína (17).	49
Esquema 3.4 – Mecanismo S_N2 da reacção de síntese de ácido <i>S</i> -(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21) sob a forma de (<i>R</i>)-2-amónio-3-(but-3-en-1-iltio)propanoato (21a) e cloreto de (<i>R</i>)-2-(but-3-en-1-iltio)-1-carboxietan-1-amínio (21b).	49
Esquema 3.5 – Passos de iniciação e propagação do mecanismo da reacção radicalar de síntese de (2 <i>R</i> ,2' <i>R</i>)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (22).	51
Esquema 3.6 – Funcionalização dos resíduos de L-cisteína de DpsT10C (23).	56
Esquema 3.7 – Reacções de acoplamento de DpsT10C (23) com DpsT10C funcionalizada com 3-bromoprop-1-eno (24a a 24c), com 4-bromobut-1-eno (24e e 24f) ou com 3-bromoprop-1-ino (24h) e de acoplamento de 23 com 1,2-bis(aliloxi)etano (25).	59

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Aminoácidos não naturais introduzidos em diversas proteínas, através de métodos metabólicos e genéticos de modificação de proteínas.	3
Tabela 2.1 – Volumes de solução padrão de L-cisteína (17) ~3 mM, HCl 0,03% e água ultrapura adicionados na preparação dos vários padrões para a recta de calibração.	31
Tabela 2.2 – Volumes de solução padrão de L-cisteína (17) ~1 mM, HCl 0,01% e água ultrapura adicionados na preparação dos vários padrões para a recta de calibração.	31
Tabela 2.3 – Condições das reacções de síntese de <i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d).	33
Tabela 2.4 – Volumes de células transformadas usados no isolamento de transformantes em placas de meio sólido LB agar com ampicilina 100 µg/mL.	36
Tabela 2.5 – Gradiente linear descontínuo de tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM) para eluição dos componentes adsorvidos à coluna de permuta iónica DEAE <i>Sepharose™ Fast Flow</i> .	38
Tabela 2.6 – Condições das reacções de funcionalização de DpsT10C (23) e monitorização do teor em grupos sulfidrilo das mesmas.	39
Tabela 2.7 – Condições das reacções de acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24).	40
Tabela 2.8 – Quantificação dos grupos sulfidrilo ao longo das várias reacções de acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24).	41
Tabela 3.1 – Tempo reaccional a que se verificou um desaparecimento dos grupos sulfidrilo >95% nas reacções de síntese dos produtos 20a a 20c .	47
Tabela 3.2 – Principais sinais dos espectros de IV e RMN dos compostos 20a a 20d .	47
Tabela 3.3 – Principais sinais dos espectros de IV e RMN dos compostos 21a , 21b e 22 .	50
Tabela 3.4 – Concentração final e volume obtidos dos bioconjugados de DpsT10C (23).	58
Tabela 3.5 – Estimativa da percentagem de subunidades das proteínas ligadas covalentemente, nos produtos das reacções de funcionalização de DpsT10C (23) 24a a 24c e 24e a 24h .	68
Tabela 3.6 – Estimativa da percentagem de subunidades das proteínas ligadas covalentemente, nos produtos das reacções de acoplamento das proteínas DpsT10C (23) e funcionalizadas 24 .	68
Tabela 3.7 – Estimativa da composição em elementos de estrutura secundária da proteína Dps e dos péletes dos produtos de acoplamento 29 (29.P) e 33 (33.P).	76

Tabela 3.8 – Valores do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersividade (PI), determinados por DLS, para a proteína DpsT10C (23) e os péletes dos produtos de acoplamento 29 (29.P) , 32 (32.P) e 33 (33.P) , antes e após a incubação com DTT.	81
Tabela III.1 – Volumes de soluções e reagentes utilizados na preparação de géis de poliacrilamida para SDS-PAGE e PAGE.	107
Tabela V.1 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização 24a a 24c e de acoplamento 26a a 26c .	111
Tabela V.2 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização 24e e 24f e de acoplamento 27a a 27c .	112
Tabela V.3 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização 24g e 24h e de acoplamento 28 .	112
Tabela V.4 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos da reacção de acoplamento 29 a 33 .	113
Tabela VI.1 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.	114
Tabela VI.2 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.	114
Tabela VI.3 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método II.	116
Tabela VI.4 – Dados para a preparação da solução padrão de L-cisteína (17) ~1 mM, sal do tampão e quantidade de DMF utilizados na construção das rectas de calibração e nas quantificações dos grupos sulfidrilo realizadas nas reacções de formação dos bioconjugados de 23 (24a a 24h) .	117
Tabela VI.5 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24a .	117
Tabela VI.6 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24a .	118
Tabela VI.7 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24b .	118
Tabela VI.8 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24b .	118

Tabela VI.9 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c .	119
Tabela VI.10 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c .	119
Tabela VI.11 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24d .	120
Tabela VI.12 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24d .	120
Tabela VI.13 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24e .	121
Tabela VI.14 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24e .	121
Tabela VI.15 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f .	122
Tabela VI.16 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f .	122
Tabela VI.17 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24g .	123
Tabela VI.18 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24g .	123
Tabela VI.19 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h .	124
Tabela VI.20 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h .	124
Tabela VI.21 – Dados para a preparação da solução padrão de L-cisteína (17) ~1 mM, sal do tampão e quantidade de DMF utilizados na construção das rectas de calibração e nas quantificações dos grupos sulfidrilo realizadas nas reacções de formação dos produtos de acoplamento 26a a 33 .	125
Tabela VI.22 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento 26a .	126
Tabela VI.23 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento 26a .	126
Tabela VI.24 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26b .	127
Tabela VI.25 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26b .	127

Tabela VI.26 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26c .	128
Tabela VI.27 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 26c .	128
Tabela VI.28 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a .	129
Tabela VI.29 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a .	129
Tabela VI.30 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27b .	130
Tabela VI.31 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27b .	130
Tabela VI.32 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c .	131
Tabela VI.33 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c .	131
Tabela VI.34 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28 .	132
Tabela VI.35 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28 .	132
Tabela VI.36 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29 .	133
Tabela VI.37 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29 .	133
Tabela VI.38 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento 30 e 33 .	134
Tabela VI.39 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento 30 e 33 .	134
Tabela VI.40 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31 .	135
Tabela VI.41 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31 .	135
Tabela VI.42 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 32 .	136
Tabela VI.43 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 32 .	136

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

δ	desvio químico ou vibração de deformação (<i>bending</i>)
ν	vibração de estiramento (<i>stretching</i>)
AFM	microscopia de força atômica
AIBN	2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo)
ANN	aminoácido não natural
as	assimétrico
Bfr	bacterioferritina
BODIPY	dipirrometeno de boro
BSA	albumina do soro bovino
CA2	anidrase carbónica II
CCMV	vírus da mancha clorótica do feijão-frade
CD	dicroísmo circular
CK2 α	subunidade catalítica da caseína cinase II
d	duplete
DLS	dispersão dinâmica de luz
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DP	desvio padrão
DPAP	2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona
Dps	<i>DNA-binding proteins from starved cells</i>
DpsT10C	proteína Dps com o resíduo de Tre 10 substituído por um resíduo de Cis
dt	duplete de tripletos
eq	equivalentes
f	forte
fp	fora do plano
fr	fraca
Ftn	ferritina clássica
GFP	proteína fluorescente verde
gp5	lisozima da cauda do bacteriófago T4
GST	S-transferase de glutationa
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	albumina do soro humano
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido

IV	infravermelho
KPB	tampão fosfato de potássio
LAP	fenil(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfinato de lítio
LB	Luria-Bertani
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
MALDI-TOF MS	espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com detecção por tempo de voo
m	múltiplo
md	média
mf	muito forte
MMAE	monometilauristatina E
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
np	no plano
OD _{600 nm}	densidade óptica a 600 nm
OmpX	proteína X da membrana externa de <i>E. coli</i>
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes
PEG	polietilenoglicol
pET-21c(+)-DpsT10C	vector de expressão pET-21c(+) com o gene que codifica para a proteína DpsT10C
PI	índice de polidispersividade
RGD	Arg-Gli-Asp
RMN	ressonância magnética nuclear
s	simétrico
S-eGFP	proteína fluorescente verde melhorada secretada
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
S _N 1	substituição nucleofílica unimolecular
S _N 2	substituição nucleofílica bimolecular
S _N 2'	reação S _N 2 com rearranjo do grupo alilo
SRCD	dicroísmo circular de radiação de sincrotrão
STxB	subunidade B da toxina de Shiga
t	tríplo
TEC	acoplamento tiol-eno
TEM	microscopia electrónica de transmissão
T _m	temperatura de fusão

Tris	2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
TS	sulfotransferase de tirosilproteína
TYC	acoplamento tiol-ino
UATR	reflectância total atenuada universal
UV	ultravioleta
Vis	visível
VLP	partícula semelhante a vírus

1. Introdução

1.1. Modificação de proteínas

A modificação de proteínas possibilita a introdução de funcionalidades que não se encontram presentes nas proteínas nativas de interesse, ou que mimetizam as modificações pós-traducionais por estas sofridas, permitindo ligar cromóforos, fluoróforos, radiomarcadores, açúcares, polímeros, *tags*, péptidos ou mesmo outras proteínas à proteína pretendida, de modo a estudar a sua estrutura, função, dinâmica e distribuição *in vivo*, a melhorar propriedades farmacocinéticas de bioconjugados terapêuticos, a aplicar bioconjugados em bioimagem ou a desenvolver vacinas e novos materiais¹⁻⁷.

Para tal, podem ser utilizados métodos metabólicos de modificação de proteínas^{4,6}, genéticos^{3,4,8}, químicos^{1,2,4,5,9} ou uma combinação de vários¹⁰⁻¹⁴.

Os métodos metabólicos, à semelhança dos métodos genéticos, permitem introduzir aminoácidos não naturais (ANN) nas proteínas de interesse durante a sua síntese, fazendo parte destes últimos a reatribuição ou supressão de codões e a utilização de codões formados por mais do que três nucleótidos^{3,4,6,8}.

Por sua vez, a reacção de Staudinger, a reacção de Mannich, a reacção de acoplamento cruzado de Sonogashira e as reacções de química de clique são exemplos de métodos químicos que possibilitam a alteração directa de proteínas^{1,2,4,5}, dos quais se aprofundará a química de clique. Quanto aos resíduos modificados quimicamente, os resíduos de lisina e cisteína destacam-se dos restantes devido à sua nucleofilicidade^{1,9}, sendo o resíduo de cisteína mais nucleofílico do que o de lisina^{1,7,15} e menos frequente em proteínas^{16,17}.

Um dos grandes desafios na modificação de proteínas consiste na introdução de modificações únicas e selectivas que originem derivados bem definidos. Embora os métodos genéticos e a baixa abundância de resíduos de cisteína em proteínas facilitem esta tarefa, a modificação introduzida não pode destabilizar a proteína. No caso das modificações químicas, o método e as condições utilizados também não podem levar à desnaturação da proteína, a reacção tem de ser rápida e não pode ser perturbada pela utilização de sais, ou surfactantes, necessários à estabilização da proteína. Caso a reacção seja aplicada *in vivo*, esta também não poderá ser tóxica para o organismo em questão.^{1,2,4,5,8,9}

1.1.1. Métodos metabólicos e genéticos

Como mencionado anteriormente, os métodos metabólicos e genéticos permitem introduzir ANN na estrutura primária de proteínas de interesse, durante o processo de tradução, respectivamente, através da incorporação por pressão selectiva e da expansão do código genético (por reatribuição ou supressão de codões ou pela utilização de codões formados por mais do que três nucleótidos).

Na incorporação de grupos funcionais por pressão selectiva, é adicionado ao meio de cultura das células de expressão (ou ao sistema de síntese proteica na ausência de células hospedeiras¹⁸) um ANN análogo a um dos aminoácidos naturais^{4,6}, ou um precursor do ANN¹⁹. A eficiência de incorporação do ANN pode ser melhorada se a célula de expressão for auxotrófica para o aminoácido a ser substituído e se a aminoacil-tRNA sintetase (endógena ou mutante) for sobreexpressa^{4,6}. Este método possibilita a modificação simultânea de todas as proteínas sintetizadas na célula num resíduo de aminoácido específico^{4,6}, podendo a incorporação generalizada de um ANN revelar-se tóxica por perturbação da maquinaria celular²⁰.

No caso dos métodos de expansão do código genético, *in vitro*, o ácido ribonucleico de transferência (tRNA) complementar previamente aminoacilado com o ANN e o gene mutado são adicionados ao extracto celular de, por exemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*)^{21,22}. Se a aminoacilação se der em simultâneo com a tradução da proteína, a aminoacil-tRNA sintetase e o ANN são também adicionados^{21,23}. Por sua vez, na síntese *in vivo*, os genes que codificam a proteína de interesse, o tRNA e a aminoacil-tRNA sintetase são introduzidos no modelo de estudos desejado – como *E. coli*^{10-12,14,24-28}, HEK293T^{10,27,29} ou peixe-zebra³⁰ –, sendo o ANN suplementado ao meio de cultura, à alimentação do organismo ou injectado neste. Os tRNAs endógenos não são reconhecidos pela aminoacil-tRNA sintetase adicionada, nem o tRNA introduzido funciona como substrato das enzimas endógenas. Contrariamente aos métodos metabólicos, os métodos genéticos permitem que a modificação pretendida seja introduzida num único resíduo de uma proteína apenas^{10,14}.

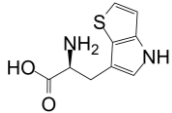
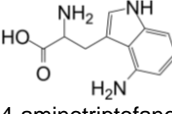
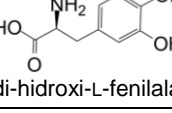
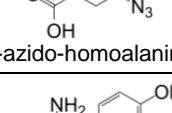
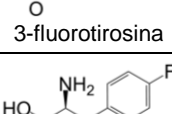
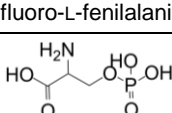
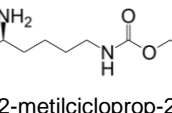
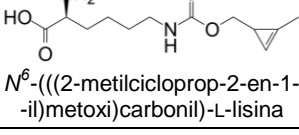
Na reatribuição de codões, o codão escolhido passa a codificar um ANN. Na supressão dos codões de terminação âmbar (UAG)^{10,12-14,21,23,24,28,30}, ocre (UAA)^{14,24} ou opala (UGA)^{14,29}, estes deixam de sinalizar a terminação da síntese proteica, sendo o gene da proteína de interesse mutado de modo a reposicionar o codão escolhido no local pretendido. O rendimento da incorporação pode ser melhorado utilizando uma célula de expressão cujo gene do factor de terminação correspondente tenha sido removido e o codão escolhido tenha sido substituído por outro no resto da sequência²⁸. No caso dos codões com sentido, se este for raro, como AGG (Arg)^{11,21,26}, pode ser mutado silenciosamente nos restantes locais que não o de interesse, de modo a não afectar a expressão dos genes essenciais do genoma²⁶. Os tRNA endógenos, envolvidos na descodificação do codão seleccionado, podem ainda ser substituídos por outros exógenos e os

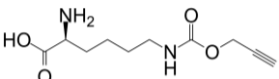
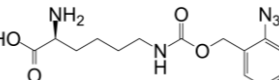
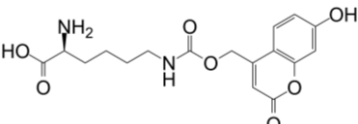
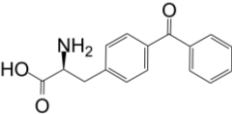
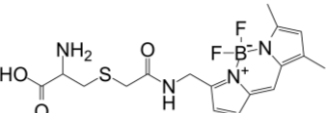
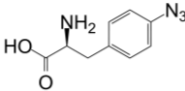
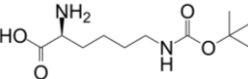
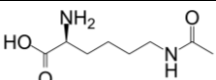
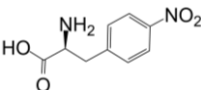
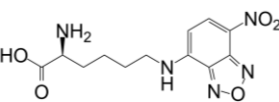
seus níveis podem ser estabilizados antes de se iniciar a sobreexpressão da proteína pretendida^{11,21,26}. Se o codão escolhido for mais frequente, como CUG (Leu)¹⁰, para além de poder ser utilizado para marcação de uma proteína sobreexpressa²⁵, pode ainda ser empregue para marcação do proteoma¹⁰.

Na utilização de codões constituídos por quatro nucleótidos ou mais, pode recorrer-se à utilização de um tRNA que tenha sofrido modificações estruturais que optimizem a sua ligação aos ribossomas²⁷, ou utilizar-se um ribossoma ortogonal que acomode um tRNA com um anticodão maior¹².

Alguns exemplos de ANN introduzidos em proteínas pelos métodos descritos encontram-se apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Aminoácidos não naturais introduzidos em diversas proteínas, através de métodos metabólicos e genéticos de modificação de proteínas.

Entrada	Aminoácido introduzido	Codão utilizado e/ou aminoácido substituído	Método de modificação de proteínas	Referências
i	 β -(4 <i>H</i> -tieno[3,2- <i>b</i>]pirrol-6-il)-L-alanina	Tri	Metabólico	31
ii	 4-aminotriptofano	Tri	Metabólico	19
iii	 3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina	Tir	Metabólico	18
iv	 4-azido-homoalanina	Met	Metabólico	13
v	 3-fluorotirosina	Tir	Metabólico	20
vi	 4-fluoro-L-fenilalanina	Fen	Metabólico	20
vii	 O-fosfoserina	UAG	Genético	24
viii	 <i>N</i> ⁶ -(((2-metilcicloprop-2-en-1-il)metoxi)carbonil)-L-lisina	UAG AAA (Lis) GCA (Ala) CUG (Leu)	Genético	10

Entrada	Aminoácido introduzido	Codão utilizado e/ou aminoácido substituído	Método de modificação de proteínas	Referências
ix	 N^6 -((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)-L-lisina	UAG UAA AGG (Arg) UUA (Leu)	Genético	10–12,14,30
x	 N^6 -(((2-azidobenzil)oxi)carbonil)-L-lisina	UAG	Genético	30
xi	 N^6 -(((7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metoxi)carbonil)-L-lisina	UAG	Genético	30
xii	 4-benzoil-L-fenilalanina	UAG	Genético	12,23
xiii	 S-(2-(((BODIPY-FL)metil)amino)-2-oxoetil)-cisteína	AGG (Arg)	Genético	21
xiv	 4-azido-L-fenilalanina	UAG AGGA	Genético	12,14
xv	 N^6 -(<i>tert</i> -butiloxicarbonil)-L-lisina	UAA AGG (Arg) AGGA	Genético	11,14,27
xvi	 N^6 -acetil-L-lisina	UAA UGA UAGA	Genético	14
xvii	 4-nitro-L-fenilalanina	CGGAC CGGCA	Genético	22
xviii	 N^6 -nitrobenzoxadiazolil-L-lisina	CGGUA	Genético	22

1.1.2. Química de clique

O termo “química de clique” foi descrito pela primeira vez por H. C. Kolb, M. G. Finn e K. B. Sharpless, em 2001³². As reacções de clique consistem em reacções que utilizam materiais de partida disponíveis, não necessitam de atmosfera inerte nem de solvente (no caso de exigirem solvente, este é não-tóxico ou facilmente removível) e os produtos podem ser facilmente isolados, sem recurso a métodos cromatográficos^{32,33}. São reacções selectivas, estereoespecíficas, favoráveis termodinamicamente (geralmente mais do que 20 kcal/mol), altamente rentáveis que originam novas ligações carbono-heteroátomo (C-X-C) e com subprodutos inofensivos³².

Das reacções de clique fazem parte cicloadições, reacções de substituição nucleofílica, reacções do grupo carbonilo e adições a ligações múltiplas carbono-carbono^{32,33}.

A utilização deste tipo de transformações tem como vantagens a sua eficiência e versatilidade, a sua aplicação na presença de água, de oxigénio e de diversos grupos funcionais e o fácil isolamento dos produtos, geralmente com elevada pureza e com rendimentos elevados^{32,33}. Coincidindo alguns dos princípios da química de clique com os princípios da química verde, ao considerar-se a economia atómica e a necessidade energética das reacções realizadas para a introdução das funcionalidades a acoplar, este tipo de reacções pode ser incorporado em sínteses mais eficientes e com menores custos e impactos ambientais³⁴.

1.1.2.1. Cicloadição

As cicloadições são reacções que se dão entre duas ou mais moléculas insaturadas (ou entre partes da mesma molécula), nas quais os seus sistemas π se combinam de modo a originar um novo aducto cíclico³⁵. Dentro deste tipo de reacções, na química de clique destacam-se as reacções [4 + 2] 1,3-dipolares e de hetero-Diels-Alder^{32,33,36,37} (Figura 1.1).



Figura 1.1 – Mecanismo geral das reacções de cicloadição [4 + 2]: **A)** 1,3-dipolares e **B)** de hetero-Diels-Alder. Adaptado de ^{38,39}.

Nas reacções 1,3-dipolares, o componente de 4 electrões π é um sistema de três átomos, que apresenta duas cargas formais de sinais contrários e deslocalização dos electrões π ^{36,38}, como, por exemplo, azidas^{10,12,13,40–43}, nitronas⁴³ ou nitriliminas^{44–46} (Figura 1.2), podendo estar presente na molécula de interesse^{40–43} ou ser gerado *in situ*^{43–46}.



A)

GST: S-transferase de glutatona

B)

S-eGFP: proteína fluorescente verde melhorada secretada

C)

OmpX: proteína X da membrana externa de *E. coli*

D)

1

6

Por sua vez, as reacções de hetero-Diels-Alder ocorrem entre um dieno 1,3 e um dienófilo com heteroátomos em qualquer uma das posições, podendo-se formar até quatro novos centros estereogénicos no heterocíclico de seis membros gerado^{37,39}. A reacção de compostos *s*-tetrazinas com alcenos^{10,51–53}, de 8-metilenquinolin-7(8*H*)-ona com um grupo tioéter vinílico⁵⁴, de uma *o*-iminoquinona com um derivado de acrilamida⁵⁵ e a reacção de Kondrat'eva entre 5-alcoxioxazole e um grupo maleimida⁵⁶ constituem algumas das reacções de hetero-Diels-Alder aplicadas à modificação química de proteínas (Figura 1.4). Embora a inerente reversibilidade das reacções de Diels-Alder dificulte a sua aplicação em processos de bioconjugação^{37,56}, os exemplos aqui apresentados tratam-se de reacções irreversíveis, devendo-se isto à perda de uma molécula pequena (como N₂^{51–53} ou EtOH⁵⁶) e/ou à aromatização da molécula formada^{54,55}.

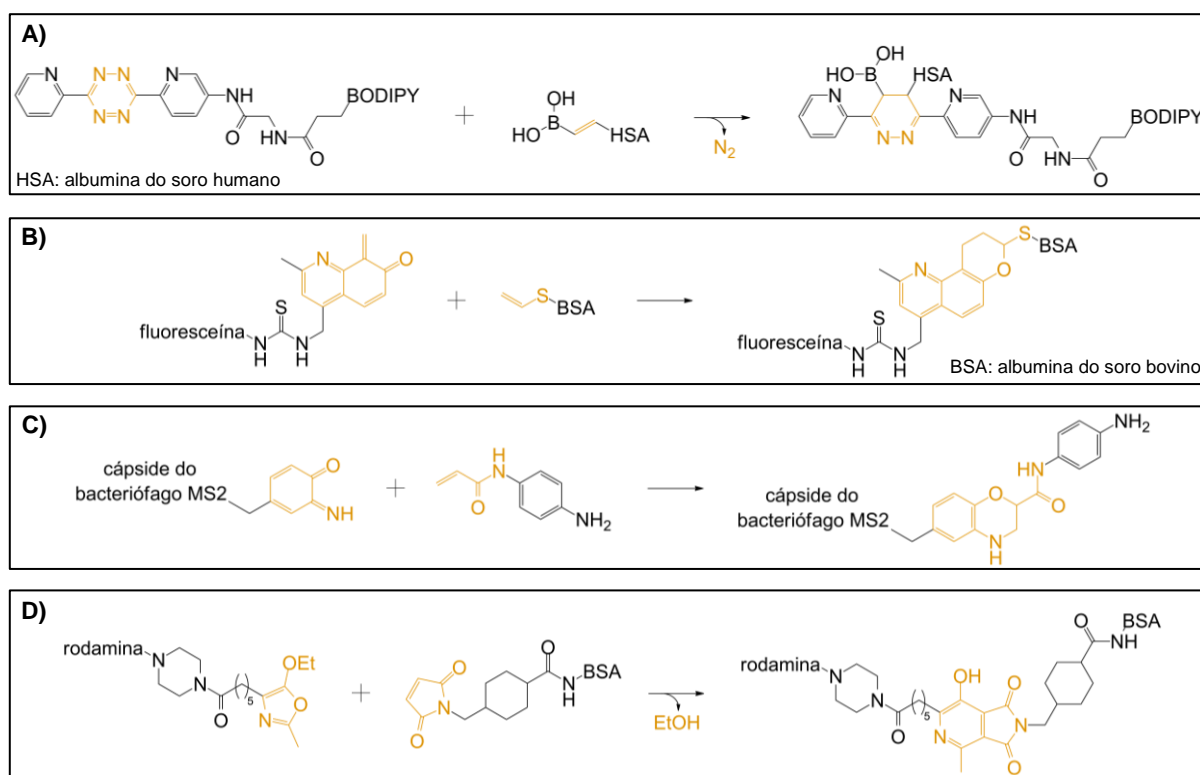


Figura 1.4 – Reacções de hetero-Diels-Alder, aplicadas a proteínas, entre: **A)** um composto *s*-tetrazina e um alceno, **B)** um grupo 8-metilenquinolin-7(8*H*)-ona e um grupo tioéter vinílico, **C)** uma *o*-iminoquinona e um derivado de acrilamida e **D)** 5-alcoxioxazole e um grupo maleimida (baseadas em ^{51,54–56}).

Uma das aplicações deste tipo de reacções consiste na formação de derivados proteicos que possam ser direccionados para um tipo de células específico^{40–42}, possibilitando, por exemplo, a entrega direccionada de fármacos a células cancerígenas e aumentando a sua potência e janela terapêutica⁴¹. Para tal, pode recorrer-se ao uso de glicopolímeros que se liguem a lectinas na superfície celular⁴⁰, de anticorpos que reconheçam um receptor membranar⁴¹, ou de sequências Arg-Gli-Asp (RGD) que sejam reconhecidas pelos receptores transmembranares integrinas⁴².

As reacções de cicloadição também podem ser empregues na formação de anéis fluorescentes de pirazolina⁴⁴⁻⁴⁶ ou na ligação de fluoróforos, como derivados de fluoresceína^{10,43,54}, de dipirrometeno de boro (BODIPY)^{10,51,52} ou de rodamina^{10,53,56}, de modo a marcar as proteínas de interesse, tanto *in vitro*^{43,44,46,51,53,54,56} como *in vivo*^{45,52}.

Outras aplicações compreendem a ciclização de calmodulinas¹², a polimerização de cadeias de ubiquitinas resistentes à actividade de proteases para a análise da sinalização por ubiquitinas¹³, e a ligação de pequenas moléculas de interesse biotecnológico, como é o caso da biotina^{43,54}.

1.1.2.2. Substituição nucleofílica (em átomos de carbonos saturados)

As reacções de substituição nucleofílica, em átomos de carbono saturados, são reacções nas quais um nucleófilo ataca um átomo de carbono saturado, formando-se uma nova ligação σ entre ambos e quebrando-se a ligação entre o átomo atacado e o grupo de saída (X), sendo este, assim, substituído pelo nucleófilo (Nu)⁵⁷. Conforme o grupo de saída abandone a molécula antes do ataque do nucleófilo, ou simultaneamente a este, a reacção prosseguirá, respectivamente, segundo um mecanismo de substituição nucleofílica unimolecular (S_N1), ou bimolecular (S_N2)⁵⁷ (Figura 1.5).



Figura 1.5 – Mecanismo geral das reacções de substituição nucleofílica: **A)** unimolecular e **B)** biomolecular (adaptado de ⁵⁷).

As principais reacções de substituição, aplicadas à química de clique, consistem na abertura de heterocíclicos tensos, como epóxidos, aziridinas, sulfatos cíclicos, sulfamidatos cíclicos, iões aziridínio ou iões epissulfónio^{32,33} (Figura 1.6), das quais apenas as duas primeiras foram aplicadas em proteínas.

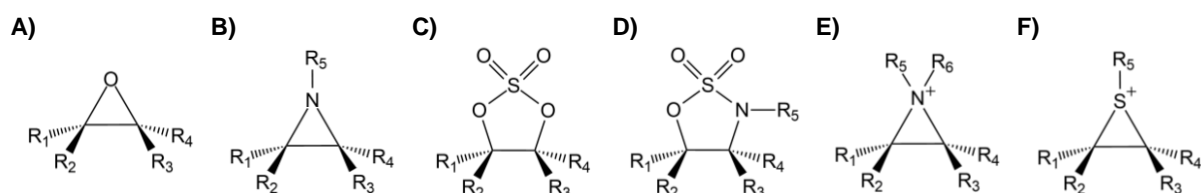


Figura 1.6 – Estrutura química dos heterocíclicos tensos: **A)** epóxido, **B)** aziridina, **C)** sulfato cíclico, **D)** sulfamidato cíclico, **E)** ião aziridínio e **F)** ião epissulfónio (estruturas desenhadas com base em ³²).

A reacção de abertura de epóxidos foi aplicada para modificar selectivamente a superfície da proteína anidrase carbónica II (CA2), servindo-se da afinidade de inibidores para o seu centro activo para introduzir a modificação em resíduos de histidina na sua proximidade^{58,59} (Figura 1.7 – A). O grupo introduzido foi posteriormente utilizado para peguilar as proteínas, ou para marcá-las fluorescentemente⁵⁹.

Por sua vez, a reacção de abertura de aziridina foi utilizada para mimetizar a acetilação de resíduos de lisina nas proteínas mutantes da histona H3 e da subunidade catalítica da caseína cinase II (CK2 α), originando o seu análogo metiltiocarbonil-tialisina, após reacção dos resíduos de cisteína com metiltiocarbonilaziridina⁶⁰ (Figura 1.7 – B). As modificações introduzidas não interferiram com o reconhecimento da proteína histona H3 por anticorpos anti-acetil-Lis específicos para as regiões acetiladas nem com a actividade catalítica de CK2 α , pelo que este tipo de modificação poderá ser utilizado para aprofundar o estudo dos processos biológicos envolvendo a acetilação de resíduos de lisina⁶⁰.

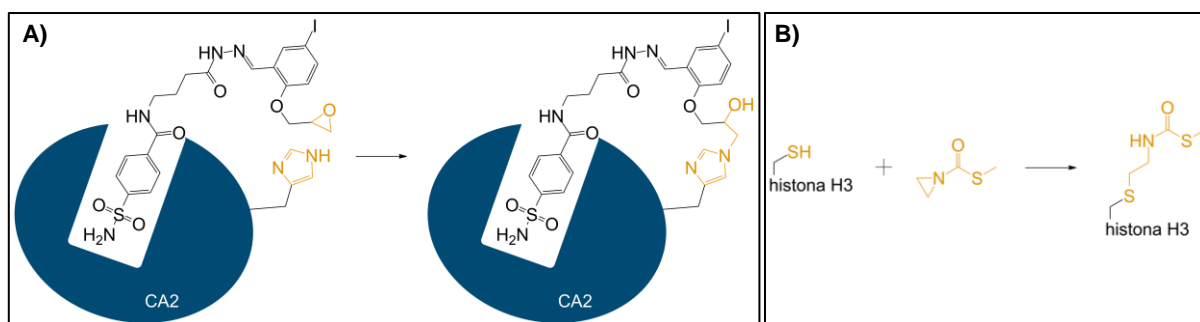


Figura 1.7 – Reacções de substituição nucleofílica de abertura de um grupo: **A)** epóxido e **B)** aziridina, aplicadas a proteínas (adaptadas de ^{59,60}).

1.1.2.3. Química do grupo carbonilo

A química do grupo carbonilo, do tipo não-aldol, engloba as reacções de formação de ureias, tioureias, heterocíclicos aromáticos, éteres de oxima, hidrazonas e amidas^{32,33} (Figura 1.8).



Figura 1.8 – Estrutura química das funcionalidades: **A)** éter de oxima e **B)** hidrazona.

A reacção de formação de ureia, a partir de um grupo isocianato e de um grupo amina, foi empregue na preparação de um conjugado péptido-proteína entre um péptido derivado do

substrato da enzima sulfotransferase de tirosilproteína (TS) e a subunidade B da toxina de Shiga (STxB)⁶¹ (Figura 1.9 – A). Encontrando-se a enzima TS na rede trans-Golgi e servindo-se a toxina de Shiga da rede de transporte retrógrado, o conjugado formado, ou outros semelhantes, poderão ser utilizados no estudo do transporte deste processo fisiológico importante⁶¹.

M. S. Cooper, *et al.* utilizaram a formação de tioureia, entre um grupo isotiocianato e um grupo amina, para formar radioimunoconjugados com o isótopo ⁶⁴Cu e o anticorpo rituximab⁶² (Figura 1.9 – B). O isótopo e o anticorpo indicados foram escolhidos como modelos por ambos possuírem utilidade clínica (o isótopo ⁶⁴Cu pode ser utilizado para tomografia por emissão de positrões, enquanto rituximab é usado, por exemplo, no tratamento do linfoma não-Hodgkin⁶³ e artrite reumatóide⁶⁴), podendo, assim, o conjugado gerado vir a ser aplicado em estudos diagnósticos e radioimunoterapia⁶².

No caso das reacções de formação de éteres de oxima (entre uma cetona e uma oxiamina)⁶⁵, de hidrazonas (a partir de um grupo aldeído e de uma hidrazina)⁶⁶ e de amidas (por reacção de um éster com um grupo amina)⁶⁷, estas foram aplicadas na ligação de diversas proteínas a fluoróforos (Figura 1.9 – C a E). Os conjugados gerados permitiram, por exemplo, demonstrar a sua aplicação no estudo de interacções proteína-proteína, através da utilização de um fluoróforo sensível ao ambiente⁶⁵; na marcação reversível de glicoproteínas sialiladas, em células HEK293⁶⁶; e em estudos de dinâmica de proteínas a nível celular ou de transferência ressonante de energia de fluorescência⁶⁷.

Quer a reacção de formação de éteres de oxima quer a de hidrazonas podem ser catalisadas pelo composto anilina^{65,66}. No entanto, a sua adição ao meio de cultura celular gera efeitos citotóxicos⁶⁸, dificultando a sua aplicação em sistemas vivos. R. Nisal, *et al.* conseguiram evitar os efeitos secundários do uso de anilina utilizando um derivado do fluoróforo a ligar portador do grupo *o*-aminobenzil-hidrazina⁶⁶.

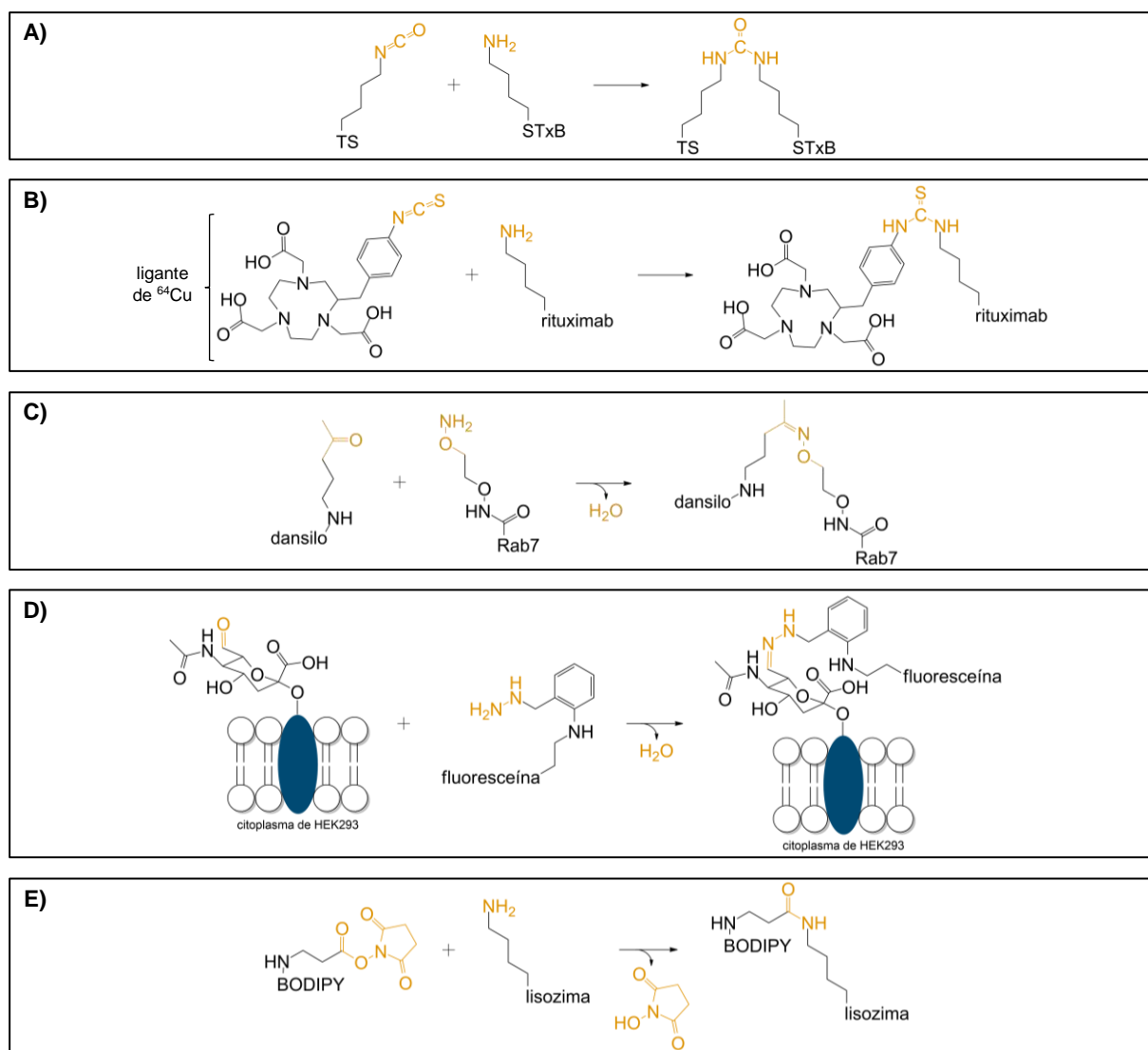


Figura 1.9 – Reacções de formação de um grupo: **A)** ureia, **B)** tioureia, **C)** éter de oxima, **D)** hidrazona e **E)** amida, aplicadas a proteínas (reacções desenhadas com base em ^{61,62,65–67}).

1.1.2.4. Adição a ligações múltiplas carbono-carbono

A adição a ligações múltiplas carbono-carbono pode ser classificada como electrofílica⁶⁹, nucleofílica⁷⁰ ou radicalar⁷¹, dependendo do tipo de espécie que inicia a reacção de adição. Aplicadas à química de clique, destacam-se as reacções de epoxidação, di-hidroxilação, aziridinação, as adições de halogeneto de sulfenilo, ou de nitrosilo, e ainda as adições de hetero-Michael de reagentes do tipo Nu-H e os acoplamentos tiol-eno e tiol-ino^{32–34,71}. No entanto, apenas foram encontrados na literatura exemplos de modificações proteicas utilizando as reacções de aziridinação, de adição de hetero-Michael e os acoplamentos tiol-eno e tiol-ino (Figura 1.10).

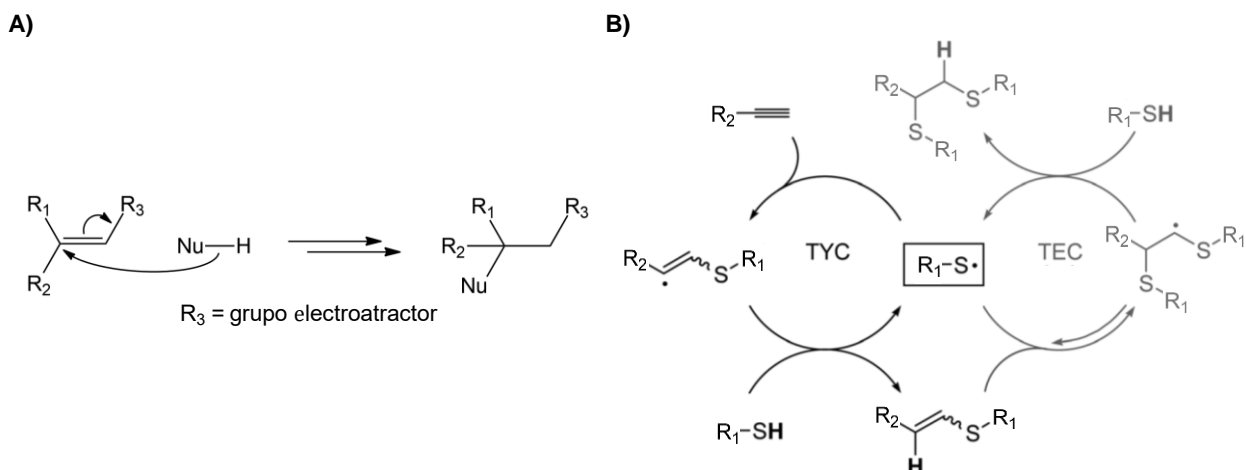


Figura 1.10 – Esquema geral das reacções de adição a ligações múltiplas carbono-carbono: **A)** adição de hetero-Michael e **B)** acoplamentos tiol-eno (TEC) e tiol-ino (TYC) (adaptados de ^{71,72}).

M. J. Gattner, *et al.* serviram-se da reacção de aziridinação da ligação dupla de norbornenos, utilizando sulfonilazidas deficientes em electrões, para acoplar uma molécula de biotina, ou o fluoróforo dansilo, às proteínas tiorredoxina de *E. coli* e CA2 humana⁷³ (Figura 1.11).

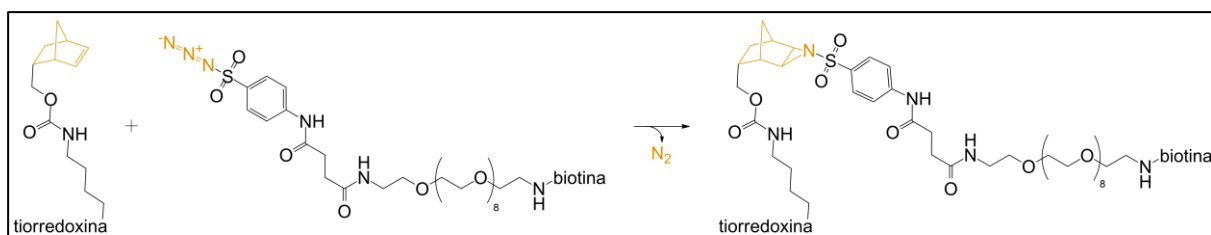


Figura 1.11 – Reacção de aziridinação de um composto norborneno por uma sulfonilazida, aplicada à proteína tiorredoxina (desenhada com base em ⁷³).

Nas reacções de adição de hetero-Michael ocorre ataque nucleofílico, que não de um carbanião, a um alceno activado por um grupo electroattractor⁷² (Figura 1.10 – A). Conforme o nucleófilo seja centrado num átomo de azoto, oxigénio, fósforo, enxofre ou selénio, a reacção adquire, respectivamente, o nome de adição de aza-⁷⁴, oxa-⁷⁵, fosfa-⁷⁶, tia-⁷⁷⁻⁸¹ ou selena-Michael⁸² (Figura 1.12). Dos nucleófilos empregues fazem parte grupos aminas⁷⁴, hidroxilos⁷⁵, alquilfosfinas⁷⁶, sulfidrilos⁷⁷⁻⁸¹ e alilselenolatos⁸². Quanto aos alcenos activados, acrilamida^{76,80}, acrilatos de sulfonilo⁷⁴, metacrilatos⁸¹, lactamas⁷⁵, maleimida^{77,78}, carbonilacrílico⁷⁹ e desidroalanina⁸² são alguns exemplos utilizados.

Uma desvantagem da adição de um grupo sulfidrilo a uma maleimida consiste no facto de o aducto formado poder participar em reacções de retro-Michael na presença de grupos sulfidrilo livres, o que pode comprometer a administração de conjugados anticorpo-fármacos para terapias em organismos, devido à transferência da carga do anticorpo para, por exemplo, albumina^{77,78}. A hidrólise do anel de succinimida – quer espontaneamente, devido ao ambiente básico em redor da ligação, quer por posterior hidrólise em meio básico – constitui num modo de estabilizar a

ligação tio succinimida gerada e superar este problema^{77,78}. Em alternativa, pode optar-se por substituir o grupo maleimida por um β -carbonilacrílico, evitando-se, assim, o passo de hidrólise⁷⁹.

Esta classe de reacções permitiu ligar diversas proteínas, de entre as quais albumina do soro humano^{74,79}, o anticorpo trastuzumab^{74,77-79}, anexina V^{74,79} e OmpX⁷⁶, a fluoróforos (derivado de fluoresceína⁷⁴, dansilo⁷⁶, Alexa Fluor™ 488^{77,78} ou nitrobenzofurazano⁷⁹), possibilitando, por exemplo, a detecção de glicoproteínas que tenham incorporado metabolicamente o monossacárido *N*-acrililgalactosamina⁷⁶ e a marcação de células HEK293 apoptóticas e células SK-BR-3⁷⁹. Para além dos conjugados com fluoróforos, foram também preparados conjugados com polietilenoglicol (PEG)^{74,79}, biotina⁷⁶ ou fármacos, como crizotinib (aprovado para o tratamento de cancro do pulmão de não-pequenas células⁸³)⁷⁴ ou monometilauristatina E (MMAE) (agente antimitótico que inibe a polimerização da tubulina⁸⁴)^{77,78}. A proteína α -queratina, tanto na sua forma solúvel como directamente em cabelo humano danificado, foi ainda conjugada com o copolímero de metacrilato de éter metílico de di(etilenoglicol) e de metacrilato de alilo, com o objectivo de encontrar métodos para aplicações em cuidados pessoais⁸¹.

No caso da ligação de moléculas aromáticas derivadas de acrilamida, nas proximidades do centro activo da proteína hidrolase de glicosídeo de *Bacteroides thetaiotaomicron*, estas resultaram num aumento da actividade enzimática, o que se revela promissor, tanto a nível biotecnológico e industrial (como forma de aumentar o desempenho das enzimas utilizadas) como para o estudo de processos biológicos (por aumento da afinidade da enzima para o seu substrato ou inibidor estruturalmente semelhante)⁸⁰.

Já a formação de uma *Se*-alil-selenocisteína nas proteínas subtilisina e histona H3 permitiu que fossem rapidamente modificadas por metátese cruzada com diversas olefinas (como álcool alílico ou *N*-alilacetamida)⁸². Caso tivessem sido utilizadas as proteínas análogas de enxofre, as modificações realizadas seriam mais demoradas, ou não ocorreriam de todo⁸².

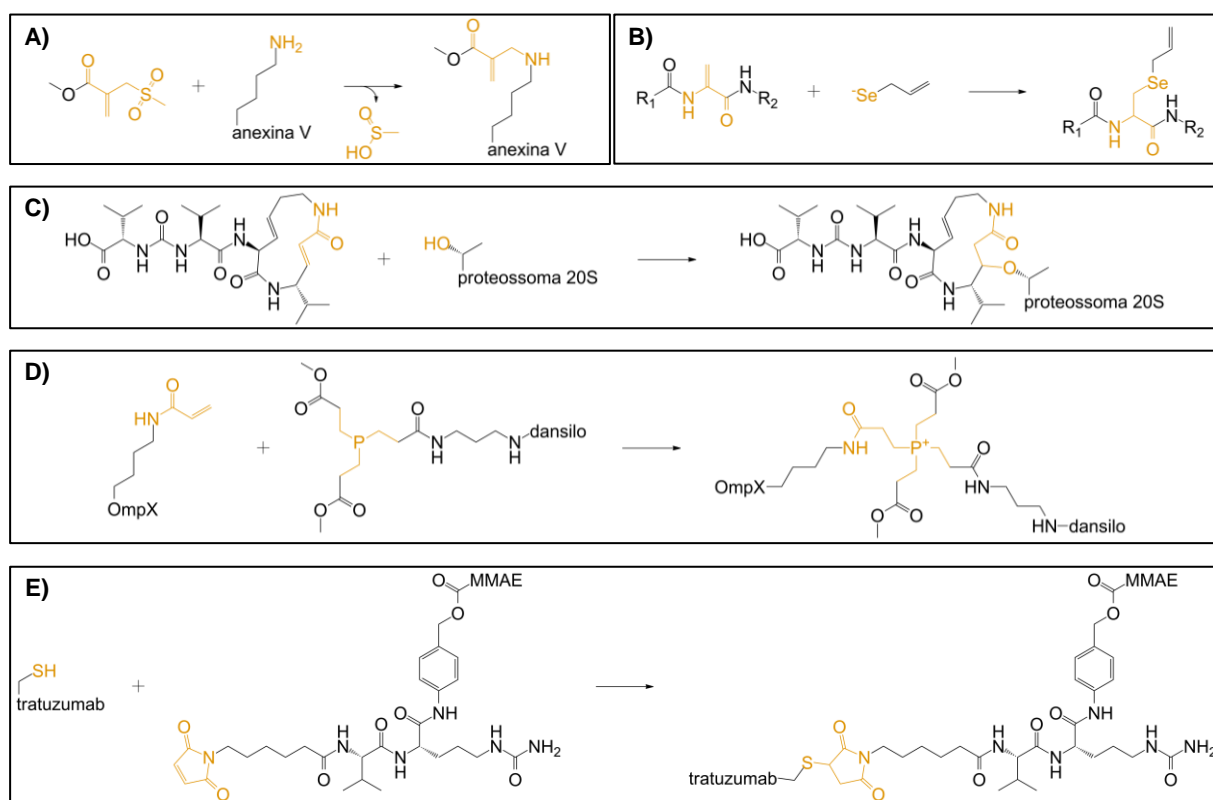


Figura 1.12 – Reacções de adição de hetero-Michael, aplicadas a proteínas, com nucleófilos centrados em átomos de: **A)** azoto, **B)** selénio, **C)** oxigénio, **D)** fósforo e **E)** enxofre (reacções desenhadas com base em ^{74-78,82}).

Os acoplamentos tiol-eno e tiol-ino consistem na adição de radicais tiis a alcenos e alcinos, respectivamente^{71,85} (Figura 1.10 – B). De modo a gerar um radical tiil, as adições podem ser iniciadas por irradiação directa com uma fonte de luz ultravioleta (UV)^{71,86,87}, sendo a ligação S-H quebrada homoliticamente, ou por utilização de um termo- ou fotoiniciador, que irá abstrair o átomo de hidrogénio do grupo sulfidrílo⁷¹. De entre os iniciadores utilizados são exemplos o fenil(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfinato de lítio (LAP) (**2**)^{85,88}, o 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (**3**)⁸⁹, o 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DPAP) (**4**)^{81,90-92}, 2-benzil-2-(dimetilamino)-1-[4-(4-morfolinil)fenil]-1-butanona (**5**)⁹⁰, o di-hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (**6**)⁸⁵, o di-hidrocloreto de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (**7**)^{93,94} e o 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (**8**)⁹¹ (Figura 1.13 – A). Posteriormente, a ligação múltipla sofre adição regiosselectiva anti-Markovnikov do radical tiil, formando-se uma ligação tioéter e um radical no átomo de carbono que removerá um átomo de hidrogénio de outro grupo sulfidrílo e completará o ciclo radicalar⁷¹. No caso do acoplamento tiol-ino, terminada a primeira adição, o alceno originado pode sofrer uma segunda adição, sendo o produto final um 1,2-ditioéter ou 1,1-ditioéter^{71,92}.

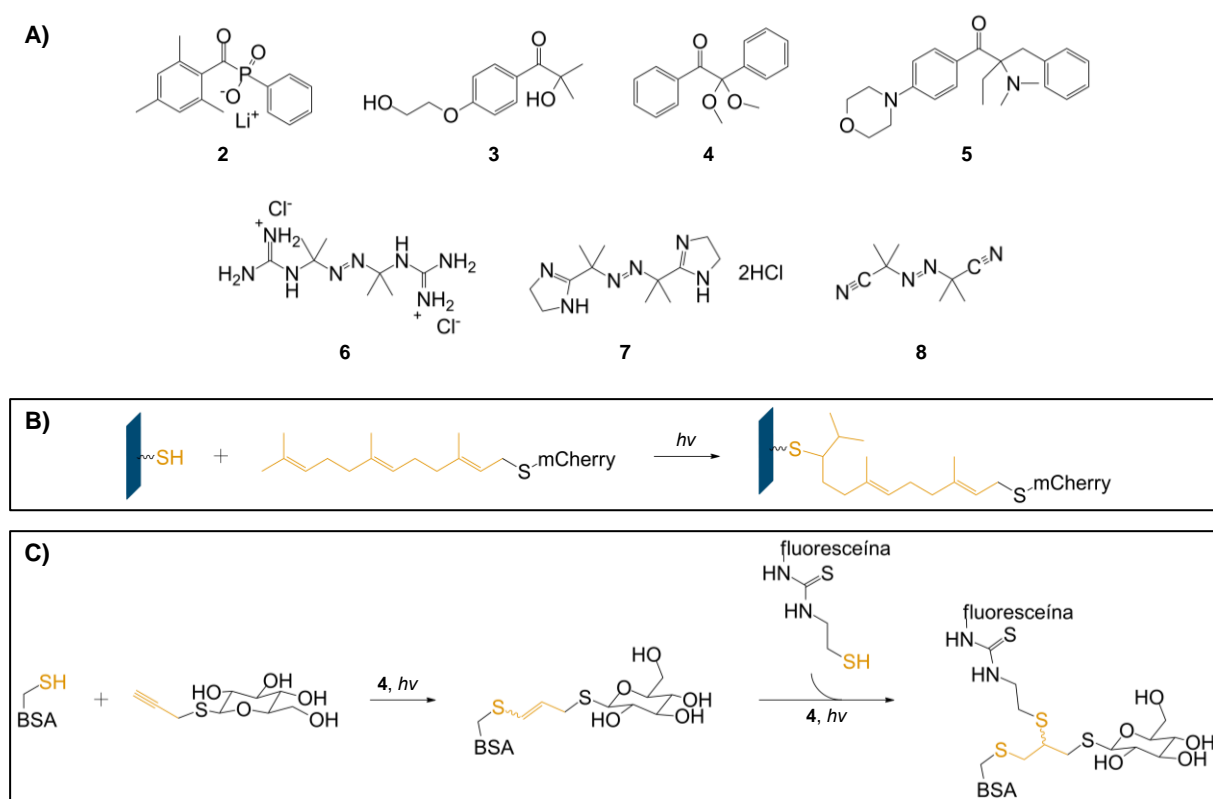


Figura 1.13 – A) Estrutura química dos iniciadores radiculares LAP (**2**), 2-hidroxi-4'-(2-hidroxi-2-metilpropiofenona) (**3**), DPAP (**4**), 2-benzil-2-(dimetilamino)-1-[4-(4-morfolinil)fenil]-1-butanona (**5**), di-hidrocloro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (**6**), di-hidrocloro de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (**7**) e AIBN (**8**) utilizados nas reacções de acoplamento tiol-eno e tiol-ino. **B)** Acoplamento tiol-eno aplicado à proteína mCherry (adaptado de ⁸⁷). **C)** Reacções sequenciais de acoplamentos tiol-ino e tiol-eno aplicadas à proteína BSA (baseado em ⁹²).

De entre os alcenos e alcinos reagidos, os grupos farnesilo⁸⁷, alilamina⁸⁵, carbamato de alilo⁸⁹ e homoalilglicina^{93,94}, propargilo⁹² e ciclooctino⁹² são alguns exemplos.

O acoplamento tiol-eno permitiu imobilizar diversas proteínas em superfícies de SiO_x/Si funcionalizadas com grupos sulfidrilos, mesmo encontrando-se a proteína pretendida no lisado celular das células de expressão hospedeiras⁸⁷ (Figura 1.13 – B). A ligação das proteínas sem que estas tivessem sofrido qualquer purificação ou modificação química adicional constituiu uma vantagem para a produção de biochips em áreas como biotecnologia, biocatálise e biomateriais⁸⁷.

Com o objectivo de elucidar a função que as cadeias ramificadas de ubiquitina possam ter *in vivo*, E. M. Valkevich, *et al.* utilizaram este tipo de reacções químicas para formar dímeros e trímeros da proteína ubiquitina, mimetizando a ligação nativa N^ϵ -Gli-L-Lis⁸⁵. Os bioconjugados proteicos gerados revelaram-se totalmente funcionais, isto é, puderam ser hidrolisados pelas proteínas desubiquitinases, e permitiram demonstrar que, nos trímeros, a orientação das três moléculas de proteína influencia a hidrólise da ligação, podendo a localização da ramificação servir como mecanismo regulatório para as interacções que dependam desta⁸⁵.

Outras aplicações consistiram na formação de heterodímeros entre uma proteína fluorescente verde (GFP) e lisozima⁸⁹, na marcação fluorescente da primeira com dansilo⁸⁹ e na ligação dos monossacáridos de glicose 1-tio- β -D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-1-tio- β -D-glicose a proteínas com diferentes motivos estruturais⁹³, podendo este último método ser utilizado no desenvolvimento de vacinas de glicoconjugados^{93,94}.

No caso do acoplamento tiol-ino, este foi utilizado, seguido do acoplamento tiol-eno, para modificar duplamente a proteína BSA com o açúcar 1-tio- β -D-glucopiranosídeo de propargilo e posteriormente com um derivado de fluoresceína (Figura 1.13 – C), ou, em alternativa, com um cicloalcino e o tripéptido glutatona⁹².

1.2. Gaiolas proteicas

As gaiolas proteicas são proteínas cuja estrutura quaternária é adquirida espontaneamente em solução a partir da interacção entre os seus monómeros, formando-se uma cavidade central que comunica com o exterior por poros formados entre as subunidades⁹⁵⁻⁹⁷. Possuem uma forma simétrica, na maioria quase esférica, e o seu tamanho varia desde 8-9 nm até 600 nm. Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, estando presentes tanto nos três domínios da vida como em vírus, e desempenhando as mais variadas funções, desde armazenamento a transporte de moléculas, passando por catálise, mineralização e desintoxicação. Ferritinas, algumas chaperonas moleculares, di-hidrolipoamida acetiltransferase, *vaults*, clatrina, compartimentos bacterianos, vírus e partículas semelhantes a vírus (VLP) constituem as gaiolas proteicas conhecidas actualmente^{96,98}.

A flexibilidade da sua estrutura e sequência (permitindo introduzir modificações pontuais), a possibilidade de prever a sua estrutura antecipadamente, a capacidade de automontagem em estruturas monodispersas bem definidas e a facilidade de produção em sistemas de sobreexpressão (sem a formação de produtos secundários tóxicos) são características que têm despertado o interesse da comunidade científica para a aplicação de proteínas, mais precisamente de gaiolas proteicas, nas áreas da nanotecnologia⁹⁵⁻⁹⁸. As características enumeradas representam vantagens relativamente aos nanodispositivos não biológicos – cujas dimensões reduzidas dificultam a sua manipulação –, consistindo os problemas comuns na preparação de estruturas com forma e tamanho bem estabelecidos e na sua posterior modificação, de modo a conferir-lhes novas propriedades, sem que ocorra alteração da estrutura geral⁹⁵.

A cavidade interna das gaiolas proteicas pode ser utilizada para encapsular moléculas, providenciar um ambiente químico diferente do exterior para a realização de determinadas reacções química, ou produzir nanopartículas ou *quantum dots* de tamanho definido⁹⁵⁻⁹⁸. As suas

superfícies, tanto externa como interna, podem ser modificadas permitindo o acoplamento de moléculas responsáveis pelo direccionamento da proteína para um alvo específico, aumento da estabilidade do conjugado na circulação sanguínea, fluorescência, catálise ou carregamento da cavidade mais fácil e selectivamente^{96,97}. Há ainda a possibilidade de alterar a interface entre as subunidades para ajustar a estabilidade das proteínas, ou a permeabilidade dos poros,⁹⁷ e de as subunidades serem utilizadas como blocos precursores automontáveis, controlados por alteração do pH ou da força iónica, por exemplo, e formando gaiolas proteicas quiméricas⁹⁶.

1.2.1. Ferritinas

As ferritinas são o membro mais abundante da superfamília de proteínas semelhantes a ferritinas (*ferritin-like superfamily*), possuindo todos os seus membros o mesmo motivo estrutural de quatro hélices α , ou parte dele⁹⁹.

Por sua vez, a família das ferritinas é composta pelas subfamílias das ferritinas clássicas (Ftn), das bacterioferritinas (Bfr) e das Dps (*DNA-binding proteins from starved cells*)⁹⁹, cujas sequências primárias apresentam um baixo nível de homologia, apesar de conservarem a mesma estrutura terciária¹⁰⁰. As Ftn existem nos três domínios da vida e, embora as Bfr e as Dps estejam presentes apenas nos domínios Bacteria e Archaea⁹⁹⁻¹⁰³, as três subfamílias podem ser produzidas por um organismo, como, por exemplo, *E. coli* (Figura 1.14)¹⁰².

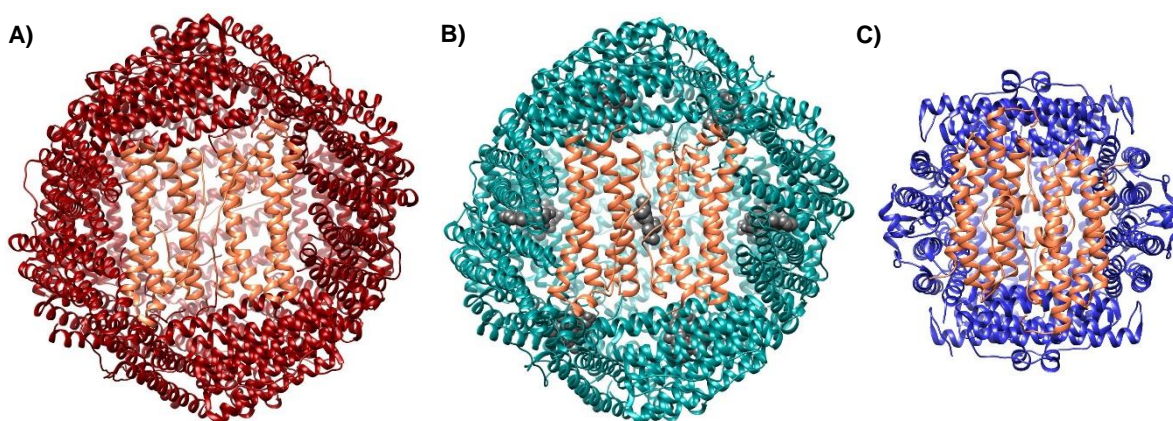
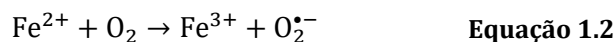
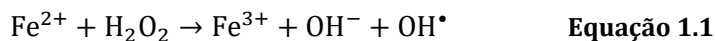


Figura 1.14 – Estrutura tridimensional das proteínas da família das ferritinas de *E. coli*, apresentadas segundo um dos eixos de rotação de ordem 2. **A)** Ftn (código PDB: 4REU). **B)** Bfr, com os grupos hemo identificados a cinzento (código PDB: 3E1J). **C)** Dps (código PDB: 5XGO).

As Ftn e Bfr têm como função principal o armazenamento de ferro^{99,101} – necessário para, entre outros processos, a síntese de DNA, regulação genética e respiração celular¹⁰², sendo, em condições aeróbias, extremamente insolúvel na forma Fe^{3+} ^{100,102,103} –, enquanto a Dps é responsável pela desintoxicação desse metal e de espécies reactivas de oxigénio (peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , radicais hidroxilo, OH^\bullet , e superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$ – Equações 1.1 e 1.2)^{99,101-103}. Estas

são expressas em bactérias em condições de *stress* oxidativo ou nutricional^{101,103}, possuindo ainda a capacidade de se ligar ao DNA de modo não específico, principalmente através da extremidade N-terminal¹⁰⁴, e de protegê-lo dos danos causados pelos iões ferrosos^{99,103}.



As Ftn e as Bfr são compostas por 24 subunidades (sendo designadas por maxiferritinas) que, na sua maioria, formam um dodecaedro rômbico com simetria do grupo pontual 432, com ~12 nm de diâmetro externo, ~9 nm de diâmetro interno e capacidade para armazenar cerca de 4500 átomos de ferro⁹⁹⁻¹⁰¹. Já as Dps possuem 12 subunidades (miniferritinas), com simetria do grupo pontual 23 e cerca de 8-9,5 nm e 4-5 nm de diâmetros externo e interno, respectivamente, sendo capazes de armazenar até 500 átomos de ferro^{99,101,103}. Cada subunidade possui ~20 kDa e é constituída por quatro hélices α organizadas em dois pares de hélices antiparalelas (pares A-B e C-D), ligados por uma ansa (ansa BC), e uma quinta hélice mais pequena na extremidade C-terminal (hélice E)^{99-101,103} (Figura 1.15 – A). No caso das Dps, a hélice E não se encontra presente, possuindo, em alternativa, uma hélice pequena na ansa BC (hélice BC)^{99,101,103} (Figura 1.15 – B).

Enquanto as Dps são homopoliméricas, as maxiferritinas Ftn e Bfr podem ser compostas por mais do que um tipo de subunidade⁹⁹⁻¹⁰¹. A título exemplificativo, as Ftn de mamíferos possuem dois tipos de subunidades: as H (*heavy*, predominantes no coração) e as L (*light*, predominantes no fígado), nas quais as subunidades L não possuem actividade de ferroxidação, responsável pela oxidação de iões Fe^{2+} , e encontram-se envolvidas no processo de nucleação do ferro, ao contrário das subunidades H⁹⁹⁻¹⁰². No caso das Bfr, estas possuem um grupo hemo na interface entre as subunidades de cada dímero (Figura 1.14 – B), ligado por um resíduo de metionina de cada

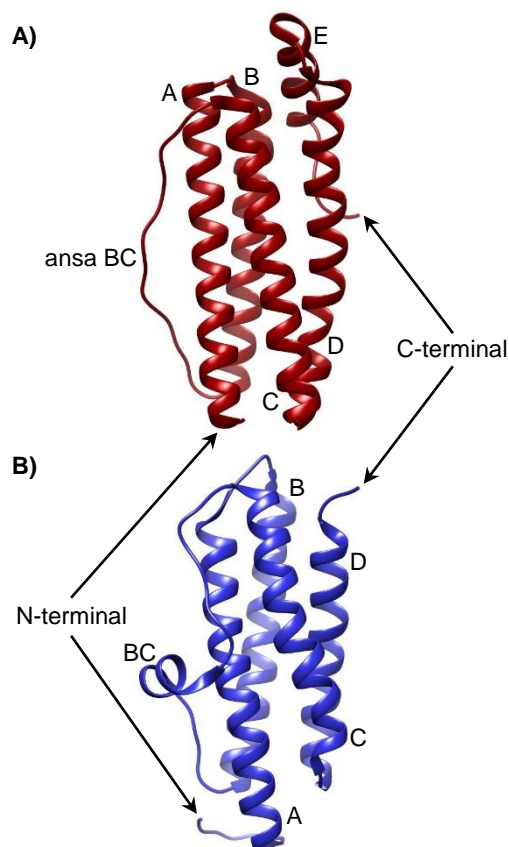


Figura 1.15 – Estrutura das subunidades das proteínas Ftn e Dps de *E. coli*, com destaque para os elementos de estrutura secundária (hélices α). **A)** Subunidade da Ftn (código PDB: 4REU). **B)** Subunidade da Dps (código PDB: 5XGO).

subunidade⁹⁹⁻¹⁰¹. Embora não se saiba a função concreta do grupo hemo, pensa-se que permita a libertação de ferro da cavidade central através de um mecanismo de redução^{99,100}.

Nos eixos de simetria e no meio das subunidades, existem canais que permitem o fluxo de ferro, assim como de outros iões bivalentes (como Zn^{2+} ou Cd^{2+}) e moléculas pequenas (O_2 e H_2O_2), entre o exterior e a cavidade central⁹⁹⁻¹⁰³. Nas maxiferritinas Ftn e Bfr, existem oito canais nos eixos de rotação de ordem 3 e seis canais nos eixos de rotação de ordem 4, cuja polaridade varia consoante a proteína e o organismo^{100,101} (Figura 1.16 – A). Nas Dps, os quatro canais nos eixos de rotação de ordem 3 formados nas extremidades N-terminal são, geralmente, hidrofílicos e os formados nas extremidades C-terminal são hidrofóbicos¹⁰³ (Figura 1.16 – B).

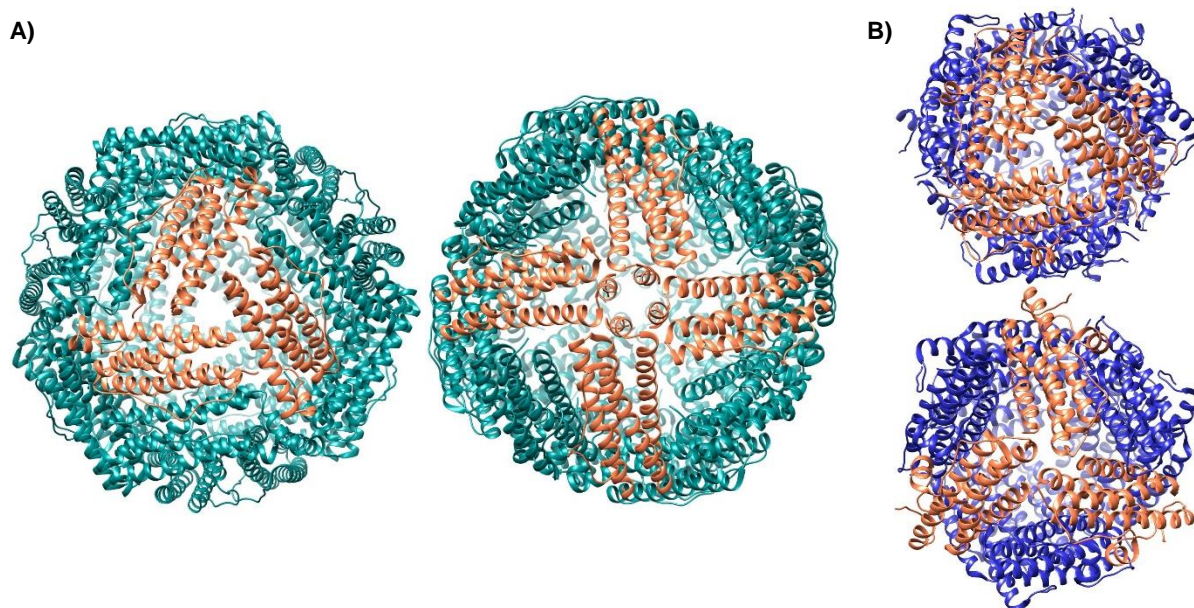
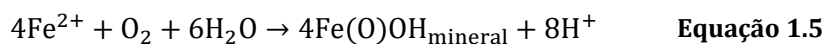
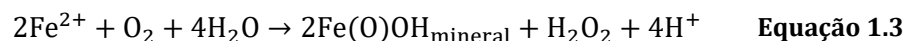


Figura 1.16 – Vista pelos canais das proteínas de *E. coli* da superfamília ferritina. **A)** Canais da Bfr formados num dos eixos de rotação de ordem 3, à esquerda, e de ordem 4, à direita (código PDB: 3E1J). **B)** Canais da Dps formados num dos eixos de rotação de ordem 3 nas extremidades N-terminal, em cima, e C-terminal, em baixo (código PDB: 5XGO).

O centro de ferroxidação, responsável pela rápida oxidação do ferro ferroso a férrico, localiza-se no centro de cada subunidade e é geralmente formado por seis resíduos das quatro hélices (quatro resíduos de ácido glutâmico e dois resíduos de histidina nas Bfr, sendo um dos resíduos de histidina substituído por um de glutamina nas Ftn⁹⁹), que coordenam dois iões Fe^{2+} ⁹⁹⁻¹⁰¹. No caso da maioria das Dps, há dois centros catalíticos localizados na interface de cada dímero, constituídos por duas histidinas, um ácido aspártico e um ácido glutâmico^{99,101,103}. Os resíduos dos centros de ferroxidação de Ftn e Bfr não são conservados nas Dps e vice-versa⁹⁹. Após a oxidação na presença de um oxidante (geralmente, O_2 nas Ftn e Bfr e H_2O_2 na Dps), o ferro férrico migra para os centros de nucleação (compostos, usualmente, por quatro resíduos carregados negativamente), na superfície da cavidade interna da proteína^{101,103}, onde mineraliza na forma de oxi-hidróxido de ferro(III) que, dependendo dos níveis de fosfato incorporado, pode

possuir uma estrutura amorfa (característicos de Bfr e Ftn procariotas) ou ser do tipo de ferridreto (característicos de Ftn eucariotas e Dps)^{99,100}. As Equações 1.3 e 1.4 representam os processos gerais de ferroxidação com O₂ e H₂O₂ como oxidantes, respectivamente, e de mineralização^{102,103}. Com o aumento da dimensão do mineral e com concentrações de ferro elevadas, é possível que os íons ferrosos que entrem directamente para a cavidade central passem também a ser oxidados na superfície deste num processo de mineralização (Equação 1.5)^{100,102,103}. O mineral formado pode ainda incluir outros metais como Zn, Cu, Cr, Mn, Co, Ni e Mo¹⁰³.



As ferritinas mantêm, assim, um mineral de ferro sólido, cujo conteúdo depende da disponibilidade celular, na forma solúvel, não-tóxica e biodisponível, mobilizando-o quando necessário, sem que as propriedades electroforéticas e cromatográficas da proteína sejam alteradas⁹⁹⁻¹⁰².

1.2.2. Aplicações biotecnológicas das proteínas da família das ferritinas

Aproveitando a função natural das ferritinas de mineralizar ferro, foi possível sintetizar nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de ferro, maguemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)¹⁰⁵ e magnetite (Fe_3O_4)¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Na sua forma apo (proteína sem ferro), as ferritinas podem servir ainda para preparar nanopartículas de cálcio (CaCO_3 , fosfato de cálcio)¹⁰⁹, crómio¹¹⁰, manganês (Mn(O)OH)¹¹¹, cobalto(III) (Co(O)OH)¹¹², Co_3O_4 ¹¹³, níquel (Ni(OH)_2)^{110,114}, zinco (ZnSe)¹¹⁵, estrôncio (SrCO_3)¹⁰⁹, paládio (Pd^0)¹¹⁶, prata (Ag^0)¹¹⁷, cádmio (CdSe)¹¹⁸, bário (BaCO_3)¹⁰⁹ ou ouro (Au_2S)¹¹⁹, Au^0 ¹²⁰). O revestimento proteico da nanopartícula impede a sua agregação e precipitação, restringindo o seu tamanho e originando materiais compósitos proteína-mineral monodispersos.

Devido às propriedades magnéticas de algumas das nanopartículas, estas poderão ser utilizadas como agente de contraste para imagem por ressonância magnética^{108,111,121}, no tratamento de cancros (como o melanoma) por hipertermia¹⁰⁷ ou para coloração de tecidos tumorais¹⁰⁸. Relativamente às nanopartículas fotoluminescentes e/ou semicondutoras, poderão ser aplicadas como marcadores em usos biológicos^{115,120}, imagem médica^{117,120} e radioterapia¹¹⁷.

Os biomateriais gerados podem servir ainda como catalisadores de reacções de, por exemplo, hidrogenação de olefinas¹¹⁶ e crescimento de filmes orientados num determinado padrão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas¹²². No primeiro caso, as olefinas são seleccionadas pela capacidade de atravessarem os canais nos eixos de rotação de ordem 3 até ao interior da proteína e, consequentemente, pelo seu tamanho¹¹⁶.

Na área da electrónica, a utilização de ferritinas permite controlar a densidade e posição das nanopartículas na superfície de deposição pretendida (como silício amorfo¹¹⁴, titânio^{113,123}, 3-aminopropiltriethoxysilano em óxido de silício¹²⁴, poli(cloreto de dialildimetilamónio)¹²⁵), utilizando um^{113,114,123,124} ou mais tipos de proteína¹²⁵. Posteriormente, a camada proteica pode ser removida e a nanopartícula pode ser utilizada como núcleo de cristalização em fase sólida de filmes finos de silício policristalino, para transístores de filme fino para mostradores planos, melhorando a cristalinidade e, consequentemente, a qualidade do filme obtido¹¹⁴. As nanopartículas posicionadas desta forma podem ainda ser aplicadas em transístores de electrão único^{113,124}, em sistemas de armazenamento de dados, transdutores de sensores e *quantum dots*¹²⁵. Outras aplicações de ferritinas consistem em memristor (*memory resistor*) cujo comportamento alterna entre comutação de memória não-volátil e de tensões limiares voláteis, para armazenamento de informação, circuitos lógico e computação neuromórfica¹²⁶, e em transístores (flexíveis ou não) de efeito de campo orgânicos, bem como para dispositivos de memória¹²⁷.

A cavidade das ferritinas pode servir ainda para encapsular diversos fármacos (como doxorrubicina¹²⁸, cisplatina¹²⁹, carboplatina¹²⁹) e fotossensibilizadores (por exemplo, hexadecafluoroftalocianina de zinco^{130,131}), permitindo aumentar o seu tempo em circulação no organismo no qual foi administrado e a sua captação por tumores que expressem receptores celulares para as proteínas¹²⁹, assim como diminuir a toxicidade a ele associada^{128,130}. Aplica-se o mesmo para os agentes de contraste anteriormente referidos¹²¹.

Conforme os compostos pretendidos sejam capazes, ou não, de atravessar os canais presentes nas proteínas, estas podem ser desnaturadas reversivelmente por variação dos valores de pH, de modo a capturá-los no seu interior^{121,129}.

A afinidade das proteínas para um certo tipo de células pode ser aumentada pela ligação de sequências específicas à sua superfície externa, como sequências RGD^{106,128,130}, hormonas estimulantes de melanócitos¹⁰⁷ ou ácido fólico¹³¹. Outras possíveis modificações consistem na introdução de fluoróforos^{106,131}, PEG¹⁰⁷, agentes quelantes¹³², péptidos capazes de se ligar a determinado material, criando padrões específicos^{113,123}, ou de outras proteínas, como o domínio C-terminal de gp5 (lisozima da cauda do bacteriófago T4¹³³) de modo a originar um novo complexo supramolecular (Figura 1.17)¹³⁴.

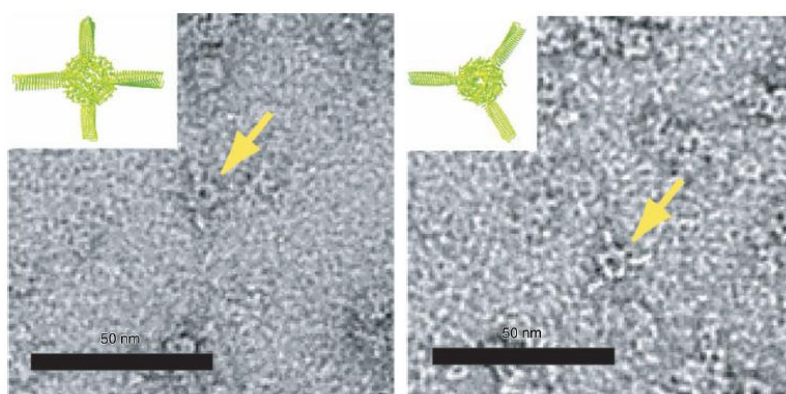


Figura 1.17 – Imagens de microscopia electrónica de transmissão (TEM) do complexo supramolecular formado pela fusão do domínio C-terminal de gp5 à extremidade N-terminal da proteína Dps de *Listeria innocua*. As setas amarelas assinalam o complexo supramolecular formado, enquanto as imagens nos cantos superiores esquerdos, apresentam o modelo teórico do mesmo. Imagem retirada de ¹³⁴.

Outros exemplos de engenharia de proteínas em ferritinas consistem na imobilização de Ftn em nanotubos de carbono de paredes simples^{135,136}, na criação de uma gaiola proteica com 16 subunidades, com forma lenticular, a partir de uma Ftn (Figura 1.18)¹³⁷, e na diminuição da polaridade da cavidade de Dps¹³⁸.

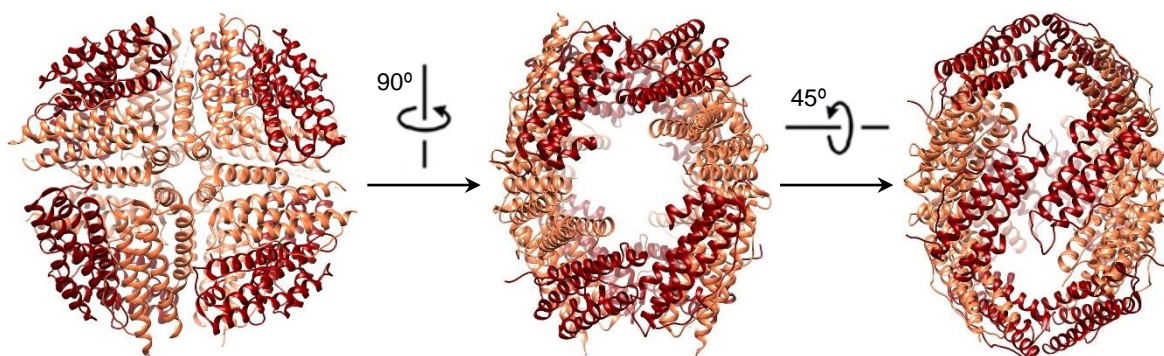


Figura 1.18 – Estrutura da gaiola proteica com 16 subunidades formada a partir da proteína recombinante Ftn humana de subunidades H, segundo os eixos de rotação de pseudo-ordem 4 (à esquerda) e 2 (ao centro e à direita) (código PDB: 5GOU).

1.3. Estruturas proteicas supramoleculares artificiais

A natureza recorre frequentemente a estruturas supramoleculares para desempenhar as mais distintas funções para a manutenção da vida. Das biomoléculas utilizadas, destacam-se as proteínas pela sua versatilidade, sendo o citoesqueleto, os compartimentos bacterianos, as partículas virais e o celulosoma alguns exemplos das estruturas possíveis de serem encontradas. O desenvolvimento e estudo de estruturas proteicas supramoleculares pode não só ajudar a compreender melhor as existentes, como também providenciar materiais e estruturas com novas características, funções e aplicações. Aqui pretende-se destacar estruturas tridimensionais

artificiais estáveis – isto é, que não levem à precipitação, associada a perda de função, das proteínas –, que formem uma estrutura do tipo rede.

B. Maity, *et al.* construíram uma proteína mutante de Ftn de baço equino e incubaram-na com KAuCl_4 de modo a incorporar 107 ± 4 átomos de Au por proteína, sendo, posteriormente, as proteínas cristalizadas pelo método de difusão de vapor em gota suspensa, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{CdSO}_4$ como precipitante, e ligadas covalentemente entre si com glutaraldeído (9) (Figura 1.19)¹³⁹. As ligações cruzadas permitiram que a estrutura de rede do cristal se mantivesse durante a reacção de redução dos iões Au(III) com NaBH_4 (Figura 1.20), possibilitando a análise dos subnanoagregados formados por difracção de raios-X¹³⁹.

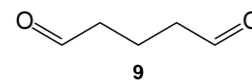


Figura 1.19 – Estrutura do glutaraldeído (9).

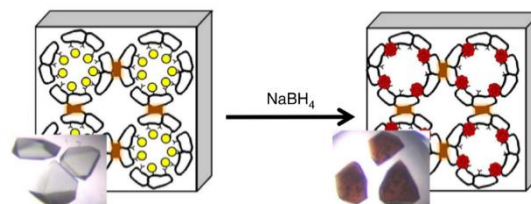


Figura 1.20 – Redução dos iões Au(III) nos cristais de uma proteína mutante de Ftn de baço equino¹³⁹.

A proteína Ftn de *Pyrococcus furiosus* e a VLP do vírus da mancha clorótica do feijão-frade (CCMV) puderam, também, ser incubadas com nanopartículas de Au com diversos grupos amina à sua superfície¹⁴⁰, com a glicoproteína avidina¹⁴¹ ou com o dendrímero poli(amidoamina) com seis gerações¹⁴¹, não com o objectivo de incorporá-los no seu interior, mas sim de formar um cristal binário (com estrutura cúbica simples, cúbica de corpo centrado ou cúbica de face centrada, dependendo dos seus constituintes – Figura 1.21) devido às interacções electrostáticas estabelecidas entre as zonas da superfície das gaiolas proteicas carregadas negativamente e a superfície carregada positivamente do outro componente escolhido. Para além da versatilidade conferida pela utilização de gaiolas proteicas, as interacções estabelecidas podem ser ajustadas por alteração dos valores de pH e força iónica do meio, o cristal pode ser funcionalizado tanto previamente como posteriormente à sua formação (com fluoróforos ou enzimas, por exemplo) e pode ainda ser seco, não ficando limitado ao meio em solução.

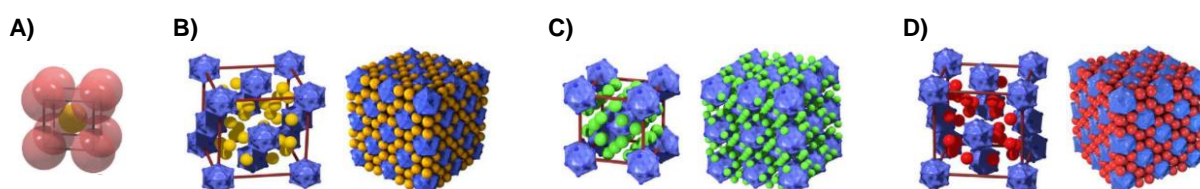


Figura 1.21 – Cristais binários formados por: **A)** Ftn e nanopartículas de Au (estrutura cúbica simples), **B)** CCMV e nanopartículas de Au (estrutura cúbica de face centrada), **C)** CCMV e a glicoproteína avidina (estrutura cúbica de corpo centrado), **D)** CCMV e o dendrímero poli(amidoamina) com seis gerações (estrutura cúbica de face centrada)^{140,141}.

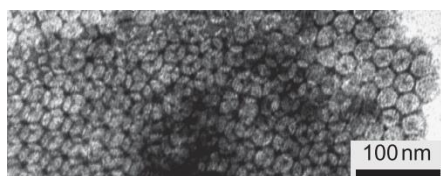


Figura 1.22 – Imagem de TEM da estrutura com empacotamento hexagonal formada por CCMV e um dendrímero fotossensível¹⁴².

As proteínas referidas foram ainda utilizadas na preparação de estruturas com empacotamento hexagonal, com centenas de nanómetros de tamanho, através do uso de dendrímeros fotossensíveis (Figura 1.22)¹⁴². Estas estruturas foram igualmente formadas pelas interações electrostáticas estabelecidas entre ambos e puderam ser dissociadas por aplicação de radiação a 365 nm, levando à libertação controlada das proteínas¹⁴².

No caso da proteína globulina de farelo de arroz, estas formam fibrilas lineares em solução que, com o aumento da força iónica do meio, agregam e ramificam, levando à formação de um gel¹⁴³. Este aumento de força iónica faz com que as forças electrostáticas repulsivas entre as fibrilas sejam atenuadas, permitindo, juntamente com a alteração da concentração de proteína, regular as características do gel gerado (Figura 1.23)¹⁴³.

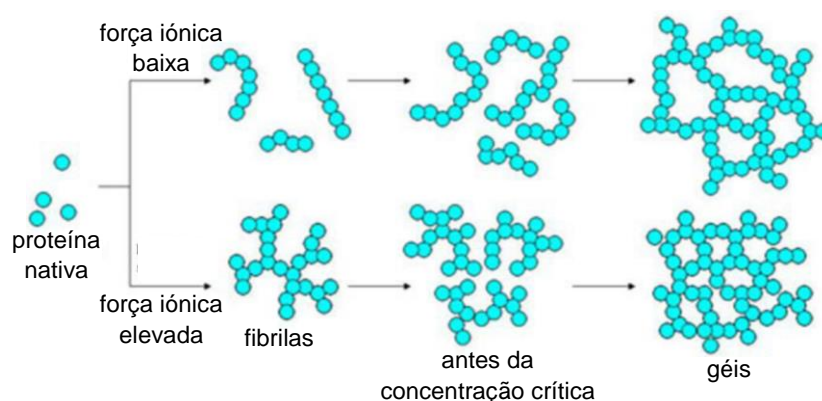


Figura 1.23 – Representação esquemática da formação de géis de globulina de farelo de arroz, a valores de força iónica baixos e elevados (figura adaptada de ¹⁴³).

Por sua vez, S. Tang e colaboradores utilizaram quatro domínios de hélice superenrolada, separados por polieletrólitos flexíveis, como monómero para produzirem hidrogéis cuja extensão das cadeias ocorreu por ligação covalente dos resíduos de cisteína presentes nas regiões N- e C-terminais do monómero, enquanto as ligações cruzadas se deram por meio de interações não covalentes entre os domínios de hélice superenrolada, formando agregados pentaméricos (Figura 1.24 – A)^{144,145}. A extensão das cadeias pôde ser levada a cabo directamente por formação de pontes dissulfureto¹⁴⁴, ou através das reacções de acoplamento tiol-maleimida¹⁴⁵ e tiol-eno¹⁴⁵ com os compostos **10** a **14** (apresentados na Figura 1.24 – B), possibilitando o entrelaçamento das cadeias e o consequente melhoramento das suas propriedades (como aumento de resistência, flexibilidade e da resistência da superfície à erosão). Nos casos aplicáveis, a reacção realizada poderá ser revertida, permitindo, assim, regular o grau de entrelaçamento das cadeias.

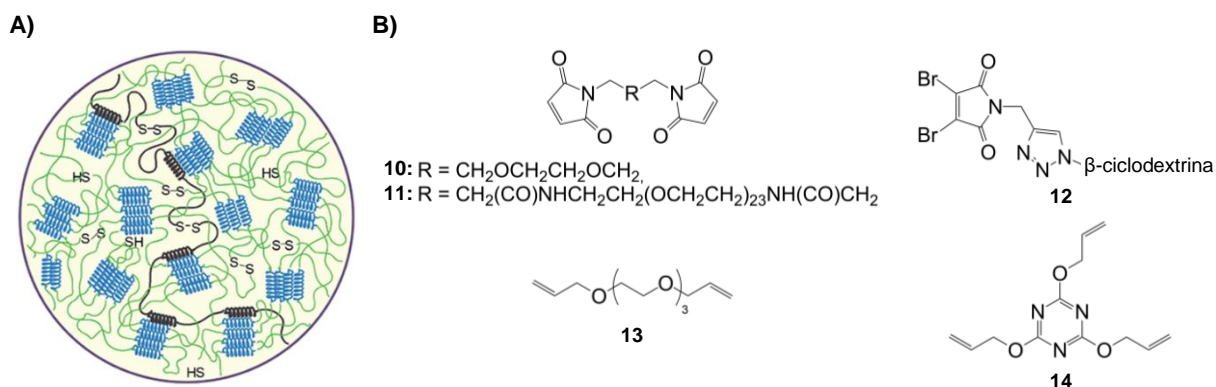


Figura 1.24 – A) Representação esquemática do hidrogel formado pelos domínios de hélice superenrolada, com extensão das cadeias através de pontes dissulfureto¹⁴⁴. **B)** Estrutura dos compostos utilizados para a extensão das cadeias dos hidrogéis utilizando as reacções de acoplamento tiol-maleimida e tiol-eno (estruturas adaptadas de ¹⁴⁵).

Por último, C. M. Madl e S. C. Heilshorn realizaram ligações cruzadas em proteínas semelhantes a elastina, que levaram à formação de um hidrogel capaz de servir como matriz para a cultura de células estaminais e cuja rigidez pode ser alterada variando a concentração das proteínas¹⁴⁶. As ligações foram introduzidas aplicando a reacção de cicloadição azida-alcino promovida pela tensão de anel, entre os resíduos de tirosina e lisina derivatizados com **15** e **16** (Figura 1.25), respectivamente¹⁴⁶.

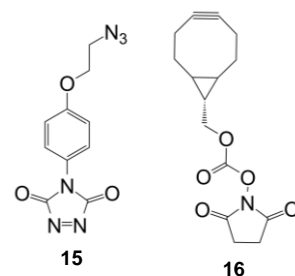


Figura 1.25 – Estrutura dos compostos utilizados nas ligações cruzadas em proteínas semelhantes a elastina.

1.4. Objectivos

Demonstrada a versatilidade tanto da química de clique como das gaiolas proteicas, a presente dissertação teve como objectivos principais a preparação e posterior caracterização de uma estrutura proteica supramolecular artificial, utilizando os acoplamentos tiol-eno e tiol-ino e uma proteína Dps mutante de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, no qual o resíduo de treonina 10 foi substituído por um resíduo de cisteína (DpsT10C, Figura 1.26).

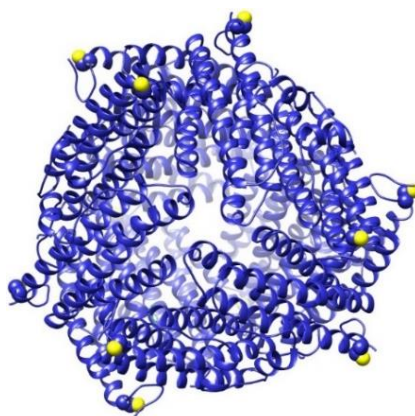


Figura 1.26 – Estrutura da proteína DpsT10C. Os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína das 12 subunidades encontram-se destacados a amarelo (estrutura cristalográfica não publicada do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA).

Na proteína mutante escolhida, o resíduo de cisteína introduzido é o único na sua sequência e localiza-se numa região móvel, exposta, na região N-terminal, o que, aliado a reacções químicas selectivas e a condições experimentais compatíveis com a proteína, permite aumentar a probabilidade de obtenção de modificações únicas e derivados bem definidos.

Relativamente à química de clique, optou-se pelos acoplamentos tiol-eno e tiol-ino (Figura 1.10 – B) por envolverem apenas uma reacção prévia de funcionalização da proteína mutante DpsT10C, de modo a introduzir uma ligação múltipla carbono-carbono, podendo, assim, a proteína obtida ser depois conjugada com aquela que lhe deu origem.

Em termos de abordagem, e como *proof of concept*, pretendeu-se testar inicialmente as reacções a aplicar no aminoácido L-cisteína livre, expressar e purificar a proteína mutante DpsT10C. Posteriormente, pretendeu-se modificar quimicamente a proteína com diversas cadeias alquílicas com comprimentos e ligações múltiplas diferentes (com três ou quatro átomos de carbono e uma ligação dupla ou tripla) e conjugá-la não só conforme o descrito no parágrafo anterior, mas também utilizando um espaçador (1,2-bis(aliloxi)etano) que não necessita que a proteína seja previamente modificada. Por fim, teve-se com objectivo analisar a influência dos diferentes espaçadores nas reacções e nas várias estruturas obtidas e caracterizá-las recorrendo a diversos métodos bioquímicos, espectroscópicos e de imagem.

2. Parte experimental

2.1. Geral

2.1.1. Programas utilizados na representação das estruturas tridimensionais das proteínas e no cálculo de parâmetros proteicos

As imagens das estruturas das proteínas apresentadas nesta Dissertação foram realizadas utilizando o programa UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>)¹⁴⁷, desenvolvido por *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics*, na Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA.

Os valores teóricos dos pontos isoelétricos (pI) e dos coeficientes de extinção molar a 280 nm das proteínas foram calculados através da ferramenta *online* ProtParam, do portal *ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal*, do Instituto Suíço de Bioinformática (<https://web.expasy.org/protparam/>)¹⁴⁸.

2.1.2. Reagentes, solventes e cromatografia em camada fina

Todos os reagentes e solventes disponíveis comercialmente foram utilizados como adquiridos, não se tendo realizado nenhuma purificação posterior. Os reagentes empregues possuíam uma pureza proanálise, excepto quando indicado.

Utilizou-se água ultrapura em todas as experiências (Diwer Technologies, W1).

Os solventes foram desarejados com quatro ciclos de 5 min de vácuo seguidos de 5 min de enriquecimento do solvente em argon.

Quando possível, as reacções foram monitorizadas por cromatografia em camada fina, usando placas de sílica-gel 60 F₂₅₄ e metanol, acetato de etilo, ou acetato de etilo:metanol (1:1), como eluente. Como agente revelador utilizou-se radiação UV, a 254 nm, solução de permanganato de potássio, solução de 2,4-dinitrofenol e/ou solução de ninidrina 0,2% em etanol com aquecimento.

2.1.3. Células de sobreexpressão, vectores de expressão, meios de cultura, antibióticos e marcadores de massas moleculares

As células de expressão competentes *E. coli* BL21(DE3), os meios de cultura Luria-Bertani (LB) granulado e LB agar granulado (alto teor em sal), o antibiótico ampicilina na forma de sal de sódio, o indutor isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) e os marcadores de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW) e NZYBlue foram fornecidos pela NZYTech.

O gene que codifica para a proteína mutante DpsT10C foi clonado no vector de expressão pET-21c(+) (Novagen), pET-21c(+)-DpsT10C, no grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA.

O genótipo das células de expressão, o mapa do vector de expressão pET-21c(+)-DpsT10C, a sequência de aminoácidos da proteína mutante DpsT10C, bem como a separação electroforética dos marcadores de massas moleculares de proteínas encontram-se apresentados nos Anexos I e II, respectivamente.

2.1.4. Procedimentos bioquímicos

As centrifugações de volumes até 2 mL foram realizadas numa centrífuga de bancada Sigma 1-14, enquanto as centrifugações de volumes superiores foram efectuadas numa centrífuga HERMLE Z 36 HK.

As diálises das proteínas foram realizadas em fitas de 25,4 mm de largura e 12-14 kDa MWCO (*molecular weight cut-off*), da Medicell Membranes Ltd, ou, quando indicado, em dispositivos Slide-A-Lyzer MINI de 3,5 kDa MWCO, da Thermo Scientific™, ambos constituídos por celulose regenerada.

Purificou-se a proteína produzida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de permuta iónica, utilizando-se um sistema cromatográfico ÄKTAprime plus, da GE Healthcare, com uma coluna 2,6 × 30 cm de resina aniónica DEAE Sepharose™ Fast Flow, da Amersham Biosciences, com o grupo dietilaminoetilo e um volume de cerca de 160 mL.

Concentraram-se as proteínas e/ou trocou-se o tampão destas usando dispositivos de ultracentrifugação Vivacell 70, com 5 kDa MWCO, ou Vivaspin 6, com 100 kDa MWCO, com membranas de polietersulfona, da Sartorius Stedim Biotech.

A concentração das várias preparações de proteínas foi determinada segundo a Lei de Lambert-Beer, assumindo-se o mesmo valor de coeficiente de extinção molar a 280 nm para todas ($2,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Nas análises da proteína DpsT10C e dos produtos das reacções de funcionalização e de acoplamento por electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não-desnaturantes (PAGE), usaram-se géis *precast* de poliacrilamida 12%, da GE Healthcare, ou polimerizados de fresco (poliacrilamida 12,5% ou 15%), segundo uma adaptação do procedimento descrito por Laemmli¹⁴⁹. Sempre que não indicado, para as análises por SDS-PAGE, as amostras de proteína foram previamente tratadas com tampão de amostras contendo β-mercaptoetanol e aquecidas a 100 °C, durante 2 min. No caso das análises por PAGE, utilizou-se tampão de amostras sem β-mercaptoetanol nem dodecilsulfato de sódio (SDS) e não se aqueceram as amostras. A composição das soluções usadas nas electroforeses encontra-se descrita no Anexo III. A separação

electroforética decorreu, geralmente, durante cerca de 40 min, nos géis SDS-PAGE, e de 1 h 10 min, nos géis PAGE, a 200 V e 200 mA, utilizando uma fonte de alimentação para electroforese GE Healthcare, modelo EPS 301. A detecção das bandas electroforéticas foi efectuada corando os géis com solução BlueSafe (NZYTech), durante aproximadamente 25 min, e lavando com água. A visualização e a digitalização dos géis foram realizadas com um transiluminador Uvitec e um sistema de imagem Kodak El Logic 100.

2.1.5. Reacções de irradiação

As reacções de irradiação foram efectuadas em células de quartzo com 1 cm de percurso óptico, utilizando uma lâmpada de arco de Xe/Hg de 200 W Newport Oriel, modelo 66902, com uma fonte de alimentação Newport Oriel, modelo 69907, e um filtro para 365 nm (transmissão entre 360 nm e 372 nm >93%) Semrock, modelo MaxLamp™, com um diâmetro externo de 25 mm (Anexo IV).

2.1.6. Análise de produtos

Os pontos de fusão foram determinados num microscópio óptico com placa aquecida REICHERT THERMOVAR.

Os espectros de infravermelho (IV) foram adquiridos num espectrómetro de infravermelho por transformada de Fourier PerkinElmer, modelo Spectrum Two, equipado com o acessório de reflectância total atenuada universal (UATR).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram registados num espectrómetro Bruker BioSpin GmbH*, a uma frequência de 400,1 MHz e 100,6 MHz, respectivamente, a 298 K. Os desvios químicos (δ) de ^1H em clorofórmio deuterado são reportados relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (0,000 ppm), enquanto em água deuterada são reportados ao sinal da água semideuterada (4,790 ppm). Por sua vez, os desvios químicos de ^{13}C em clorofórmio deuterado são dados relativamente ao sinal ^{13}C do solvente (77,16 ppm) como referência.

As leituras de absorvância foram realizadas num espectrofotómetro de luz ultravioleta-visível (UV-Vis) Thermo SCIENTIFIC, modelo EVOLUTION 300, com uma largura de banda de 1 nm, utilizando células de quartzo de 0,5 cm ou de 1 cm de percurso óptico (Hellma).

As análises por espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com detecção por tempo de voo (MALDI-TOF MS) foram efectuadas pelos serviços do

* O espectrómetro de RMN faz parte da Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN), apoiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (RECI/BBB-BQB/0230/2012).

Laboratory for Biological Mass Spectrometry, Isabel Moura (LBMS-IM), LAQV/Requimte, FCT NOVA.

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram recolhidos num espectrómetro AppliedPhotophysics, modelo Chirascan[†], na gama de comprimentos de onda de 195 nm a 260 nm, com um intervalo de dados de 1 nm e uma largura de banda de também 1 nm, utilizando-se uma célula de quartzo com 0,02 cm de percurso óptico. Adquiriram-se os espectros iniciais das proteínas, assim como após as rampas de temperatura, a uma temperatura de 20 °C, com um tempo de aquisição por ponto de 2 s. Realizaram-se as rampas de temperatura entre 20 °C e 90 °C, e vice-versa, a uma velocidade de 1 °C/min e com um tempo por ponto de 0,4 s.

Por sua vez, os espectros de dicroísmo circular de radiação de sincrotrão (SRCD) foram adquiridos, na linha de feixe AU-CD, na instalação de SRCD ASTRID2, na Universidade de Aarhus, Dinamarca[‡]. Traçaram-se os espectros numa célula de quartzo com um percurso óptico de 0,01008 cm, a 25 °C, entre 170 nm e 280 nm, com um intervalo de dados de 1 nm e uma largura de banda de 1 nm, com um tempo por ponto de 2,725 s e com 15 medições em cada ponto.

As medições de dispersão dinâmica de luz (DLS) foram realizadas num analisador de nanopartículas HORIBA Scientific, modelo nano partica SZ-100-Z, a uma temperatura de 25 °C, com o ângulo de dispersão a 90° e em células de plástico de quatro faces descartáveis. As medições foram realizadas três vezes consecutivas, durante 5 min, com um intervalo de 10 s entre medições, com redução do ruído e com uma forma de distribuição padrão monodispersa, escolhendo-se água como meio de dispersão.

As amostras a serem analisadas por microscopia de força atómica (AFM) foram aplicadas numa mica de moscovite grau V1 (TED PELLA, INC) clivada de fresco. As imagens de AFM foram obtidas com um sistema MFP-3D Stand Alone, da marca ASYLUM RESEARCH, utilizando uma ponta de silício OLYMPUS, modelo AC240TS (com revestimento reflector de alumínio no lado do detector, uma frequência de ressonância de 70 kHz e uma constante de mola de 1,7 N/m), em modo de contacto intermitente, à temperatura ambiente e em meio líquido[§].

2.1.7. Quantificação de grupos sulfidrilo

As rectas de calibração e as amostras para determinação do teor em grupos sulfidrilo ao longo das reacções foram preparadas segundo adaptações do protocolo descrito por C. K. Riener e colaboradores¹⁵⁰.

[†] *BioLab, Biological and Chemical Analysis Facility, UCIBIO-LAQV/Requimte, FCT NOVA*

[‡] Ao abrigo da acção COST Action (CA15126 MOBIEU) e do projecto CALIPSOplus (Grant Agreement 730872), HORIZON 2020.

[§] No âmbito de um projecto de colaboração com a Professora Elvira Fortunato, CENIMAT/FCT NOVA.

Em tubos de 1,5 mL, colocou-se 500 μ L de tampão fosfato de potássio (KPB) 100 mM pH = 8,0, NaCl 100 mM (ou KI 100 mM, dependendo do sal do tampão da reacção) e 450 μ L de água ultrapura. Caso se tenha usado *N,N*-dimetilformamida (DMF) na reacção a monitorizar, adicionou-se 1 μ L, 5 μ L ou 48 μ L (conforme o seu teor na reacção), e subtraiu-se o volume adicionado ao de água ultrapura.

No caso da recta de calibração, acrescentou-se solução padrão de L-cisteína (97%, SIGMA-ALDRICH®) (**17**) ~3 mM, HCl 0,03%, ou ~1 mM, HCl 0,01% e água ultrapura de acordo com as Tabelas 2.1 e 2.2, conforme a concentração da solução padrão. Utilizou-se a solução padrão imediatamente após preparação e realizaram-se duplicados dos padrões.

Tabela 2.1 – Volumes de solução padrão de L-cisteína (**17**) ~3 mM, HCl 0,03% e água ultrapura adicionados na preparação dos vários padrões para a recta de calibração.

Padrão	1	2	3	4	5	6
Solução padrão de 17 a ~3 mM (μ L)	0	3	5	7,5	10	12,5
Água ultrapura (μ L)	30	27	25	22,5	20	17,5

Tabela 2.2 – Volumes de solução padrão de L-cisteína (**17**) ~1 mM, HCl 0,01% e água ultrapura adicionados na preparação dos vários padrões para a recta de calibração.

Padrão	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solução padrão de 17 a ~1 mM (μ L)	0	2	4	6	8	10	15	22,5	30
Água ultrapura (μ L)	30	28	26	24	22	20	5	7,5	0

As amostras a quantificar foram preparadas em triplicado, salvo quando referido o contrário, a diferentes concentrações, num volume final de 30 μ L.

Juntou-se 20 μ L de reagente de Ellman (5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) 7,8 mM, etilenodiaminotetracetato dissódico di-hidratado 0,2 mM, NaH₂PO₄ 100 mM pH = 7,0) e homogeneizou-se por inversão dos tubos. Ao fim de 5 min de incubação à temperatura ambiente, leu-se a absorvância a 412 nm contra água ultrapura.

Realizaram-se os seguintes quatro controlos do método de quantificação:

- C1: adicionou-se 14,9 μ L de 3-bromoprop-1-eno (97%, SIGMA-ALDRICH®) (**18a**) (167 μ mol) a 2 mL de tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM;
- C2: adicionou-se 17,6 μ L de 4-bromobut-1-eno (~97%, SIGMA-ALDRICH®) (**18b**) (167 μ mol) a 2 mL de tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM;

- C3: adicionou-se 18,6 μL de 3-bromoprop-1-ino (80% p/p em tolueno, SIGMA-ALDRICH®) (**18c**) (167 μmol) a 2 mL de tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM;
- C4: irradiou-se a 365 nm, durante 1 h, 267 μL de **2**^{**} a 500 μM em tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM (0,134 μmol).

Em C1, C2 e C3, retirou-se 30 μL da solução, enquanto em C4 retirou-se 15 μL antes de se iniciar a irradiação da solução e após 30 min e 60 min do início da irradiação, analisando-se como se de amostras com grupos sulfidrilo se tratassem.

2.2. Síntese de *N*-acetil-*S*-alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)

2.2.1. Método geral I

A *N*-acetil-L-cisteinato de etilo^{**} (**19**), adicionou-se tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM desarejado e reagente alquilante (**18**), colocando-se sob agitação magnética e atmosfera de argon. Quantificaram-se os grupos sulfidrilo ao longo da reacção e, quando o valor de absorvância lido atingiu 0,02-0,03, extraiu-se com 3×3 mL de acetato de etilo, lavou-se a fase orgânica combinada com 1,5 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Após filtração, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e secou-se o óleo obtido sob pentóxido de fósforo, no exsicador.

Dissolveu-se 0,55 mg de **19** (2,9 μmol) em 3,67 mL de tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM desarejado, sob atmosfera de argon, e quantificaram-se de imediato os grupos sulfidrilo a partir de 30 μL da solução ($t = 0$ min).

Por este método, realizaram-se as reacções i a iii da Tabela 2.3.

2.2.2. Método geral II

Neste método de síntese, diminui-se a quantidade de reagente alquilante usado no método I em cerca de 67 vezes.

Dissolveu-se **19** em tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM desarejado, sob agitação magnética e atmosfera de argon. Após dissolução total de **19**, quantificaram-se os grupos sulfidrilo ($t = 0$ min) e adicionou-se **18**. Monitorizou-se o desaparecimento dos grupos sulfidrilo ao longo da reacção e, assim que o valor de absorvância lido atingiu 0,02-0,03, extraiu-se com 3×4 mL de

^{**} sintetizado no grupo de Síntese Molecular, LAQV/Requimte, FCT NOVA

acetato de etilo, lavou-se a fase orgânica combinada com 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio e secou-se com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se a fase orgânica, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e secou-se o óleo obtido sob pentóxido de fósforo, no exsiccador.

Realizaram-se as reacções iv a vi da Tabela 2.3.

Na reacção v, após finalização da mesma, separou-se o óleo amarelo claro dos cristais amarelo claro dissolvendo-o em *n*-hexano e evaporando, posteriormente, o solvente ao ar.

Tabela 2.3 – Condições das reacções de síntese de *N*-acetil-*S*-alil-*L*-cisteinato de etilo e compostos relacionados (**20a** a **20d**).

Reacção	19 (mg; μmol)	Tampão ^a (mL)	18; $V_{\text{adicionado}} (\mu\text{L})$; $n (\mu\text{mol})$; eq ^b	Tempo reaccional ^c (min)	Vutilizado na quantificação dos grupos sulfidrílo (μL)	Produto	Aspecto do produto	Rendimento (mg)
i	0,37; 1,9	2,47	18a ; 18,4; 206; 107	10; 20	30	<i>N</i> -acetil- <i>S</i> -alil- <i>L</i> -cisteinato de etilo (20a)	Óleo amarelo claro	Quantitativo
ii	0,37; 1,9	2,47	18b ; 21,7; 206; 107	10; 20; 30; 60; 120; 15 h 45 min	30	<i>N</i> -acetil- <i>S</i> -(but-3-en-1-il)- <i>L</i> -cisteinato de etilo (20b)	Óleo amarelo claro	Quantitativo
iii	1,06; 5,54	7,06	18c ; 65,7; 590; 106	10; 20	30	<i>N</i> -acetil- <i>S</i> -(prop-2-in-1-il)- <i>L</i> -cisteinato de etilo (20c)	Óleo amarelo intenso	Quantitativo
iv	29,63; 154,9	4	18a ; 22,4; 251; 1,6	10; 20; 30; 60; 75; 130	1 (30 μL a $t = 75$ min e $t = 130$ min)	20a + (2 <i>R</i> ,2' <i>R</i>)-3,3'-dissulfanodiil-bis(2-acetamidopropanoato) de dietilo (20d)	Óleo amarelo claro	19,04 (20a:20d 4:1, por RMN)
v	29,94; 156,5	4	18b ; 26,4 + 26,4 (a $t \approx 48$ h); 250 + 250; 1,6 + 1,6	10; 20; 30; 60; 90; 130; 439; 22 h 56 min; 26 h 18 min; 5 d 1 h 36 min	1	20b	Óleo amarelo claro	2,12
						20d	Sólido amarelo claro	14,74
vi	30,58; 159,9	4	18c ; 27,9; 250; 1,6	10; 20; 30; 60; 90; 130	1	20c + 20d	Óleo amarelo intenso	24,26 (20c:20d 3:1, por RMN)

^a Tampão KBP 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM desarejado

^b eq: equivalentes

^c Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrílo.

***N*-acetil-*S*-alil-*L*-cisteinato de etilo (**20a**). IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm^{-1}):** 3441-3139 (fr, ν NH), 3121-2882 (fr, ν CH/CH₂/CH₃), 1738 (mf, ν C=O), 1654 (mf, amida I – ν C=O), 1532 (f, amida II – δ N-H/ ν C-N), 1372 (f, δ_s CH₃), 1204 (mf, ν_{as} C-O-C), 1183 (mf, ν_{as} C-O-C), 1129 (f, ν_s C-O-C), 1025 (f, δ OCH₂), 992 (md, δ_{fp} =CH-), 920 (md, δ_{fp} =CH₂), 623 (f, δ N-C=O), 591 (md, δ N-C=O). **¹H-RMN (400,1 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 6,421-6,284 (1H, m, NH), 5,831-5,673 (1H, m,

=CH-), 5,179-5,079 (2H, m, =CH₂), 4,826-4,748 (1H, m, (C-2)H), 4,271-4,172 (2H, m, OCH₂CH₃), 3,130 (2H, d, *J* = 7,1 Hz, CH₂CHCH₂S), 2,970 (1H, dd, *J* = 13,8 e 4,8 Hz, (C-3)H), 2,881 (1H, dd, *J* = 13,8 e 5,4 Hz, (C-3)H), 2,052 (3H, s, COCH₃), 1,302 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C-RMN (100,6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171,03 (C=O), 169,89 (C=O), 133,71 (=CH-), 117,95 (=CH₂), 61,92 (OCH₂CH₃), 51,85 (CHNH), 35,27 (CH₂CHCH₂S), 32,86 ((C-3)H₂), 23,23 (COCH₃), 14,22 (OCH₂CH₃).

N-acetil-S-(but-3-en-1-il)-L-cisteinato de etilo (20b). IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3441-3140 (fr, ν NH), 3121-2800 (fr, ν CH/CH₂/CH₃), 1739 (mf, ν C=O), 1655 (mf, amida I – ν C=O), 1533 (f, amida II – δ N-H/ν C-N), 1372 (f, δ_s CH₃), 1206 (mf, ν_{as} C-O-C), 1130 (f, ν_s C-O-C), 1025 (f, δ OCH₂), 918 (md, δ_{fp} =CH₂), 623 (md, δ N-C=O), 592 (md, δ N-C=O).

N-acetil-S-(prop-2-in-1-il)-L-cisteinato de etilo (20c). IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3438-3139 (fr, ν NH/≡CH), 3125-2883 (fr, ν CH/CH₂/CH₃), 1736 (mf, ν C=O), 1652 (mf, amida I – ν C=O), 1532 (f, amida II – δ N-H/ν C-N), 1372 (f, δ_s CH₃), 1208 (mf, ν_{as} C-O-C), 1129 (f, ν_s C-O-C), 1024 (f, δ OCH₂), 700-600 (md, δ ≡CH), 624 (f, δ N-C=O), 591 (md, δ N-C=O). ¹H-RMN (400,1 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,434-6,272 (1H, m, NH), 4,916-4,747 (1H, m, (C-2)H), 4,307-4,166 (2H, m, OCH₂CH₃), 3,406-3,173 (3H, m, CHCCH₂S e (C-3)H), 3,125 (1H, dd, *J* = 14,1 e 5,5 Hz, (C-3)H), 2,303 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, ≡CH), 2,061 (3H, s, COCH₃), 1,350-1,273 (3H, m, OCH₂CH₃). ¹³C-RMN (100,6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,92 (C=O), 170,04 (C=O), 79,37 (≡C-), 72,05 (≡CH), 62,10 (OCH₂CH₃), 51,81 (CHNH), 33,80 ((C-3)H₂), 23,26 (COCH₃), 19,98 (CHCCH₂S), 14,22 (OCH₂CH₃).

(2R,2'R)-3,3'-dissulfanodiilbis(2-acetamidopropanoato) de dietilo (20d). IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3438-3141 (fr, ν NH), 3120-2883 (fr, ν CH/CH₂/CH₃), 1737 (mf, ν C=O), 1651 (mf, amida I – ν C=O), 1526 (mf, amida II – δ N-H/ν C-N), 1373 (f, δ_s CH₃), 1196 (mf, ν_{as} C-O-C), 1129 (f, ν_s C-O-C), 1023 (f, δ OCH₂), 662 (md, δ_{fp} NH), 584 (f, δ N-C=O), 507 (md, δ C-(N)C=O). ¹H-RMN (400,1 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,421-6,284 (2H, m, NH), 4,826-4,748 (2H, m, (C-2)H e (C-2')H), 4,271-4,172 (4H, m, OCH₂CH₃), 3,407 (2H, dd, *J* = 14,2 e 4,6 Hz, (C-3)H e (C-3')H), 3,349 (2H, dd, *J* = 14,2 e 6,1 Hz, (C-3)H e (C-3')H), 2,352 (6H, s, COCH₃), 1,302 (6H, t, *J* = 7,1 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C-RMN (100,6 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,31 (C=O), 170,02 (C=O), 62,11 (OCH₂CH₃), 52,19 (CHNH), 31,03 ((C-3)H₂ e (C-3')H₂), 23,12 (COCH₃), 14,16 (OCH₂CH₃).

2.3. Síntese de S-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a e 21b)¹⁵¹

A 2,0014 g de **17** (16,5 mmol), adicionou-se 28 mL de etanol e 20 mL de hidróxido de sódio 2,0 M, previamente desarejados borbulhando uma corrente de azoto. Após dissolução total, voltou a desarejar-se durante 5 min e adicionou-se 3,4 mL de **18b** (32 mmol, 2,0 eq) em 3 mL de éter dietílico. Colocou-se sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 26 h. Ao fim deste

tempo, acidificou-se a solução arrefecida em banho de gelo até pH \approx 3, por adição de ácido clorídrico concentrado. O precipitado branco formado (**21a**) (8,85%, 0,2468 g) foi filtrado e seco num exsiccador sob pentóxido de fósforo. Concentrou-se a solução filtrada por evaporação, a pressão reduzida, até cerca de metade do seu volume e deixou-se a 4 °C, durante 24 h. Os cristais beges formados (**21b**) (56,9%, 1,9165 g) foram filtrados, secando-se posteriormente sob pentóxido de fósforo.

(R)-2-amónio-3-(but-3-en-1-iltio)propanoato (21a). P.f.: 195-197 °C (decomposição). **IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):** 3277-2456 (md, ν NH₃⁺/CH₂/CH), 1618 (md, δ_{as} NH₃⁺), 1578 (mf, ν_{as} COO⁻), 1483 (mf, δ_{s} NH₃⁺), 1410 (mf, ν_{s} COO⁻), 1390 (f, ν_{s} COO⁻), 1342 (md, δ CH), 1303 (f, δ_{fp} CH₂), 915 (f, δ_{fp} =CH₂), 848 (f, δ_{fp} =CH₂), 611 (md, δ_{np} COO⁻), 540 (f, δ_{fp} COO⁻), 454 (md, δ_{np} COO⁻). **¹H-RMN (400,1 MHz, D₂O) δ (ppm):** 5,960-5,830 (1H, m, =CH-), 5,170 (1H, d, J = 17,3 Hz, =CH_{trans}), 5,111 (1H, d, J = 10,2 Hz, =CH_{cis}), 3,972 (1H, dd, J = 7,5 e 4,1 Hz, (C-2)H), 3,163 (1H, dd, J = 14,8 e 4,1 Hz, (C-3)H), 3,058 (1H, dd, J = 14,8 e 7,5 Hz, (C-3)H), 2,721 (2H, t, J = 7,1 Hz, CH₂CHCH₂CH₂S), 2,397 (2H, dt, J = 7,1 e 6,4 Hz, CH₂CHCH₂CH₂S). **¹³C-RMN (100,6 MHz, D₂O) δ (ppm):** 172,70 (C=O), 136,98 (=CH-), 116,28 (=CH₂), 53,46 (C=O), 32,77 (CH₂), 31,86 ((C-3)H₂), 30,62 (CH₂).

Cloreto de (R)-2-(but-3-en-1-iltio)-1-carboxietan-1-amínio (21b). P.f.: 167-178 °C (decomposição). **IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):** 3268-2472 (md, ν NH₃⁺/CH₂/CH/OH), 1725 (mf, ν C=O), 1640 (fr, ν C=C), 1584 (md, δ_{as} NH₃⁺), 1490 (mf, δ_{s} NH₃⁺), 1225 (f, ν C-O), 1196 (mf, ν C-O), 919 (f, δ_{fp} =CH₂), 819 (mf, δ_{fp} =CH₂), 508 (md, δ COO). **¹H-RMN (400,1 MHz, D₂O) δ (ppm):** 5,950-5,808 (1H, m, =CH-), 5,153 (1H, d, J = 17,4 Hz, =CH_{trans}), 5,099 (1H, d, J = 10,2 Hz, =CH_{cis}), 4,28 (1H, dd, J = 7,2 e 4,3 Hz, (C-2)H), 3,226 (1H, dd, J = 14,9 e 4,3 Hz, (C-3)H), 3,126 (1H, dd, J = 14,9 e 7,2 Hz, (C-3)H), 2,720 (2H, t, J = 7,1 Hz, CH₂CHCH₂CH₂S), 2,386 (2H, dt, J = 7,1 e 6,4 Hz, CH₂CHCH₂CH₂S). **¹³C-RMN (100,6 MHz, D₂O) δ (ppm):** 170,85 (C=O), 136,85 (=CH-), 116,36 (=CH₂), 52,38 (C=O), 32,74 (CH₂), 31,17 ((C-3)H₂), 30,83 (CH₂).

2.4. Acoplamento de L-cisteína (**17**) e S-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (**21a**)

Dissolveu-se, com recurso a ultra-sons, 12,4 mg de **17** (102 μ mol) e 17,7 mg de **21a** (101 μ mol, 1,0 eq) em 1 mL de tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM desarejado borbulhando-se uma corrente de azoto. Dissolveu-se 14,7 mg de **2** (50,0 μ mol, 0,49 eq) em 150 μ L de tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM desarejado. Adicionou-se a primeira solução à segunda e transferiu-se para a célula de quartzo, irradiando-se a 365 nm, sob agitação magnética, durante 2 h 10 min. O precipitado branco formado (**22**) (rendimento quantitativo) foi centrifugado a

3000 g, lavado com água ultrapura, centrifugado novamente e seco sob pentóxido de fósforo, no exsiccador.

(2R,2'R)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (22). P.f.: 228 °C (decomposição). **IV (UATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):** 3297-2414 (md, ν NH₃⁺/CH₂/CH), 2051 (mfr, δ_{as} NH₃⁺), 1588 (mf, ν_{as} COO⁻), 1525 (f, δ_{s} NH₃⁺), 1417 (f, ν_{s} COO⁻), 1355 (f, δ CH), 1305 (md, δ_{fp} CH₂), 1061 (md, δ_{np} NH₃⁺/ ν CN), 530 (mf, δ_{fp} COO⁻). **¹H-RMN (400,1 MHz, D₂O + DCl) δ (ppm):** 3,792-3,668 (2H, m, (C-2)H e (C-2')H), 2,664-2,552 (2H, m, (C-3)H e (C-3')H), 2,552-2,428 (2H, m, (C-3)H e (C-3')H), 2,103-1,928 (4H, m, SCH₂CH₂CH₂CH₂S), 1,128-0,979 (4H, m, SCH₂CH₂CH₂CH₂S). **¹³C-RMN (100,6 MHz, D₂O + DCl) δ (ppm):** 169,93 (C=O), 51,92 ($\underline{\text{C}}$ =O), 51,73 ($\underline{\text{C}}$ =O), 30,68 (SCH₂CH₂CH₂CH₂S), 30,57 ((C-3)H₂ e (C-3')H₂), 27,01 (SCH₂CH₂CH₂CH₂S).

2.5. Transformação química de células competentes *E. coli* BL21(DE3)

Após descongelamento das células competentes *E. coli* BL21(DE3) em gelo, transferiu-se 50 μ L, 30 μ L (controlo positivo) e 20 μ L (controlo negativo) das mesmas e adicionou-se 5 μ L de pET-21c(+)-DpsT10C e 1 μ L de pNZY28 0,1 ng/ μ L às duas primeiras alíquotas, respectivamente.

Colocou-se as três alíquotas em gelo, por 30 min; seguindo-se um choque térmico a 42 °C, durante 40 s; e nova incubação em gelo, por mais 2 min.

Adicionou-se 900 μ L de meio de cultura LB e incubou-se a 37 °C, durante 2 h, agitando-se a 220 rpm (incubadora com agitação orbital OVAN).

De modo a seleccionar os transformantes e a avaliar a eficiência da transformação, plaqueou-se os volumes apresentados na Tabela 2.4 em meio de cultura LB agar com ampicilina 100 μ g/mL, incubando-se posteriormente a 37 °C durante a noite (~16 h).

Tabela 2.4 – Volumes de células transformadas usados no isolamento de transformantes em placas de meio sólido LB agar com ampicilina 100 μ g/mL.

Placa	Volume plaqueado (μ L)		
	pET-21c(+)-DpsT10C	Controlo positivo	Controlo negativo
1	50	100	100
2	Volume resultante da centrifugação a 8000 g, por 3 min, do remanescente das reacções de transformação, remoção do sobrenadante por inversão e ressuspensão do respectivo pélete	-	-

2.6. Sobreexpressão e purificação de DpsT10C (23)

A proteína recombinante DpsT10C (23) foi sobreexpressa e purificada de acordo com os protocolos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA.

Preparou-se um pré-inóculo de 5 mL de meio de cultura LB com ampicilina 100 µg/mL, repicando-se uma colónia de transformantes com pET-21c(+)-DpsT10C e incubando-se a 37 °C, por 8 h, com agitação a 220 rpm. Posteriormente, inoculou-se 100 mL do mesmo meio de cultura com 1 mL do pré-inóculo, incubando-se nas mesmas condições, durante ~16 h (inóculo).

Para a sobreexpressão da proteína, 10 mL do inóculo foram diluídos em 1 L de meio de cultura LB com ampicilina 100 µg/mL (4×1 L), realizando-se o crescimento da cultura a 37 °C, a 220 rpm. Assim que a densidade óptica a 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) atingiu ~0,5, retirou-se uma alíquota de 1,5 mL e induziu-se a expressão proteica com IPTG 1 mM. Após 3 h, retirou-se uma alíquota de 1 mL e mediu-se o valor de $OD_{600\text{ nm}}$.

Recolheram-se as células por centrifugação a 11 000 *g*, a 8 °C, durante 10 min. Ressuspendeu-se os péletes obtidos em tampão 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (Tris)-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM.

Lisou-se as células com 3 ciclos de congelação-descongelação seguidos de sete ciclos de sonicação durante 3 min e arrefecimento em gelo entre cada ciclo. Fraccionou-se o lisado celular centrifugando-se, em primeiro lugar, a 10 000 *g*, a 8 °C, durante 10 min. Aliquotou-se 500 µL do sobrenadante e ressuspendeu-se o pélete em 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM. Em segundo lugar, centrifugou-se o sobrenadante restante a 42 000 rpm (ultracentrífuga preparativa BECKMAN COULTER, modelo Optima™ LE-80K), a 4 °C, durante 1 h, reservando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o pélete em 2 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM.

De modo a avaliar a produção proteica, aplicaram-se as várias alíquotas recolhidas normalizadas num gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. A normalização das amostras foi realizada centrifugando-se a 8000 *g*, à temperatura ambiente, durante 3 min, o volume, em mililitros, resultante do quociente entre 0,4 e o valor da $OD_{600\text{ nm}}$ de cada amostra e ressuspendendo-se os péletes em tampão de amostras de SDS-PAGE. Por sua vez, as fracções resultantes das centrifugações diferenciais foram normalizadas retirando-se 1 µL por cada 5 mL de volume das fracções.

A purificação da proteína, iniciou-se com a diálise do sobrenadante da ultracentrifugação (extracto proteico) em 4,5 L de tampão Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM, a 4 °C, por ~16 h, seguida de centrifugação a 10 000 *g*, a 8 °C, durante 10 min. Filtrou-se o extracto proteico dialisado, aliquotou-se 1 mL do mesmo e aplicou-se o restante numa coluna cromatográfica de

permuta iónica DEAE *Sepharose*TM *Fast Flow*. Lavou-se a coluna com tampão A (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM), recolhendo-se a solução eluída. A eluição dos componentes adsorvidos foi efectuada através de um gradiente linear descontínuo de tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM), de acordo com a Tabela 2.5, a um caudal de 5 mL/min e com um volume de fraccionamento de 12 mL.

Tabela 2.5 – Gradiente linear descontínuo de tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM) para eluição dos componentes adsorvidos à coluna de permuta iónica DEAE *Sepharose*TM *Fast Flow*.

Intervalo de tempo do gradiente (min)	Gradiente de tampão B (%)
0-30	0-30
30-190	30-70
190-195	70-100

A presença e grau de pureza da proteína nas várias fracções eluídas na cromatografia de permuta iónica foram confirmados por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%).

As fracções 42 a 45 (fracção global I), 46 a 51 (fracção global II) e 52 a 54 (fracção global III) foram juntas, de acordo com a pureza de **23**. Posteriormente, concentraram-se as fracções globais I e II num Vivacell 70, a 11 °C, com agitação orbital de 125 rpm.

Por fim, traçou-se os espectros de UV-Vis, em células de quartzo de 1 cm de percurso óptico, das fracções globais I e II, determinou-se a sua concentração e analisou-se por SDS-PAGE.

2.7. Preparação de DpsT10C (**23**) para as reacções

Incubou-se entre 500 µL a 1000 µL de proteína **23** purificada na secção 2.6 com DTT 10 mM, durante 2 h, à temperatura ambiente. O DTT foi posteriormente removido e o tampão simultaneamente trocado por concentração num Vivaspin 6, a 4500 g, a 8 °C, durante 5-10 min, seguida de seis ciclos com adição de 2 mL de tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM (KI 50 mM no caso das reacções de formação de **24e**, **24f** e **24h**) desarejado e concentração a 4500 g, a 8 °C, durante 5-20 min. Nas reacções de irradiação, o tampão a pH = 8,0 foi substituído pelo mesmo tampão a pH = 5,7.

Transferiu-se a solução proteica para um tubo de 1,5 mL e centrifugou-se a 10 000 g, à temperatura ambiente, durante 15 min.

Por fim, determinou-se a concentração da proteína diluída em 1:100 por espectrofotometria de UV-Vis.

2.8. Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)

Após a preparação da proteína **23**, esta foi diluída com tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM (KI 50 mM no caso das reacções de síntese de **24e**, **24f** e **24h**) desarejado para a concentração pretendida (31,4 μ M ou 15,7 μ M) e os grupos sulfidrilo, quantificados em 30 μ L ($t = 0$ min). Adicionou-se o reagente de funcionalização em DMF e deixaram-se progredir as reacções sob atmosfera de árgon e agitação magnética (nas reacções de formação de **24e** a **24h**, agitou-se a 140 rpm, num agitador orbital OVAN), monitorizando-se o desaparecimento dos grupos sulfidrilo ao longo do tempo, com 30 μ L de meio reaccional. A composição das reacções, assim como a quantidade de reagente alquilante adicionado e os momentos de quantificação dos grupos sulfidrilo, encontram-se indicados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Condições das reacções de funcionalização de DpsT10C (**23**) e monitorização do teor em grupos sulfidrilo das mesmas.

Bioconjugado de 23	Sal do tampão da reacção	23 ^a		Reagente alquilante em DMF; c (M); V _{adicionado} (μ L); n (μ mol); eq	Tempo reaccional ^b (min)
		V (μ L)	$n_{\text{grupos -SH}}$ (μ mol)		
24a	NaCl	3624	0,683	18a ; 1,67; 45,3; 75,7; 111	15
24b	NaCl	4108	0,774	18a ; 1,67; 51,4; 85,8; 111	15
24c	NaCl	4532	0,854	18a ; 1,67; 56,7; 94,7; 111	15
24d	NaCl	2769	0,522	18b ; 1,66; 34,6 + 312 (a $t = 75$ min); 57,4 + 518; 110 + 1099	10; 20; 40; 135; 195
24e	KI	3798	0,750	18b ; 7,48; 95,0; 711; 993	10; 20; 30; 40; 50; 60; 85
24f	KI	4774	0,899	18b ; 7,48; 119,4; 893; 993	(realizaram-se duplicados) 10; 20; 30; 40; 50; 60
24g	NaCl	4687	0,883	18c ; 1,70; 57,6; 98; 111	10; 20; 30; 40; 50; 60; 90
24h	KI	4045	0,762	18c ; 1,70; 46,0; 78,2; 103	10; 20; 30; 40; 50; 60

^a Realizaram-se todas as reacções a 15,7 μ M.

^b Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Terminaram-se as reacções 5 min após a última quantificação de grupos sulfidrilo, dialisando-se o meio reaccional em 1 L de tampão KPB 50 mM pH = 8,0 (5,7 no caso de **24e**), NaCl 50 mM, a 4 °C, durante 2 \times 1 h.

As reacções de formação de **24f**, **24g**, e **24h** foram terminadas a $t = 70$ min, $t = 105$ min e $t = 75$ min, respectivamente, centrifugando-se, num Vivaspin 6, a 5000 g , a 8 °C, durante 5-10 min e permutando-se o tampão para KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM (KI 50 mM para **24f**), adicionando-se seis vezes 2 mL.

Centrifugou-se a 10 000 g , a 8 °C, durante 15 min, e traçou-se o espectro de UV-Vis do produto da reacção diluído entre 1:10 e 1:100, calculando-se posteriormente a sua concentração.

2.9. Acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24)

Tanto a proteína **23** como as proteínas funcionalizadas (**24a** a **24c**, **24e**, **24f** e **24h**) foram preparadas conforme o descrito na secção 2.7, não se realizando a incubação com DTT no caso das segundas (para **24e** não foi efectuada a troca de tampão, apenas se concentrou num Vivaspín 6, centrifugando-se a 4000 *g*, a 8 °C, durante 3 × 5 min e a 2500 *g*, durante 2 × 5 min). Quantificaram-se os grupos sulfidrilo de **23** em 10/15 µL de uma solução a 83,3-167,9 µM (*t* = 0' min)

Na célula de quartzo, colocou-se tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM (KI 50 mM para a reacção de formação de **27c**) desarejado, proteína **23**, proteína funcionalizada (1,2-bis(aliloxi)etano⁺⁺, **25**, no caso da síntese de **29**) e **2** no tampão da reacção, de acordo com a Tabela 2.7. Nas reacções de formação de **26a** a **26c** e **27a**, realizou-se uma nova quantificação dos grupos sulfidrilo (*t* = 0 min) com 15 µL do meio reaccional.

Tabela 2.7 – Condições das reacções de acoplamento de DpsT10C (**23**) e DpsT10C funcionalizada (**24**).

Produto	Volume do tampão da reacção ^a (µL)	[23] (µM); V (µL)	24; c (M); V _{adicionado} (µL)	Grupos -SH e - SR (µmol; eq)	2		Equivalentes	Duração da reacção (min)
					[2] (mM); V _{adicionado} (µL); n (µmol)	Tempo reaccional da adição (min)		
26a	6,7	296,2; 75,1	24a ; 139,2; 160	0,267; 1	5,30; 25,2; 0,134	0	0,50	60
26b	62	357,0; 62,3	24b ; 241,0; 92,3	0,267; 1	5,30; 50,4; 0,267	0	1,0	120
26c	-	213,0; 104,5	24c ; 193,2; 115,2	0,267; 1	5,30; 3 × 16,8; 3 × 0,089	0, 30, 60	0,33; 0,54; 0,74	120
27a	97,6	270,3; 82,3	24e ; 368,6; 60,4	0,267; 1	5,00; 26,7; 0,134	0	0,50	120
27b	35	285,3; 36,2	24e ; 368,6; 28	0,118; 1	5,00; 12 × 2,08; 12 × 0,0104	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	0,088; 0,13; 0,20	120
27c	55,4	234,1; 95	24f ; 368,6; 63,2	0,267; 1	5,00; 20 × 4,45; 20 × 0,0222	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80 95; 100; 105; 110 125; 130; 135; 140	0,083; 0,096; 0,11; 0,13; 0,15	180
28	-	294,9; 150,9	24h ; 303,1; 73,4	0,534/0,267; 2/1	5,10; 12 × 4,37; 12 × 0,0223	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	0,042; 0,046; 0,050	120
29	66,65	474,4; 93,8	- ^b	0,534/ ^c ; 1/ ^d	5,10; 12 × 8,73; 12 × 0,0445	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	0,083; 0,093; 0,10	120
30	43	365,2; 121,9	-	0,534; 1	- ^e	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	-	120
31	^f	419,1; 106,2	-	0,534; 1	- ^e	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	-	120

⁺⁺ sintetizado no grupo de Síntese Molecular, LAQV/Requimte, FCT NOVA

					2			
Produto	Volume do tampão da reação ^a (μL)	[23] (μM); V (μL)	24; c (M); V _{adicionado} (μL)	Grupos -SH e - SR (μmol; eq)	[2] (mM); V _{adicionado} (μL); n (μmol)	Tempo reaccional da adição (min)	Equivalentes	Duração da reação (min)
32	46,4	375,3; 118,5	-	0,534; 1	- ^e	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	-	120
33	69,6	466,9; 95,3	-	0,534; 1	5,23; 12 × 8,51; 12 × 0,0445	0; 5; 10; 15 35; 40; 45; 50 65; 70; 75; 80	0,083; 0,093; 0,10	120

^a Tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM (KI 50 mM no caso de **27c**) desarejado

^b 1,85 μL de **25** 0,144 M com DMF 10% v/v em tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM desarejado

^c 0,533 μmol de ligações C=C de **25**

^d 1 eq de ligações C=C de **25**

^e 12 × 8,51 μL de tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM desarejado

^f 58,514 μL de tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM desarejado + 0,186 μL de DMF

Posteriormente, irradiou-se a 365 nm (excepto nas sínteses de **30** e **31**), sob agitação magnética, monitorizando-se o desaparecimento dos grupos sulfidrilo ao longo do tempo, usando 10/15 μL de meio reaccional (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 – Quantificação dos grupos sulfidrilo ao longo das várias reacções de acoplamento de DpsT10C (**23**) e DpsT10C funcionalizada (**24**).

Produto	Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo (min)	Volume de meio reaccional utilizado para a quantificação (μL)
26a	0; 30; 60	15
26b	0; 30; 60; 120	15
26c		
27a		
27b	30; 60; 120	15 (realizaram-se duplicados)
27c	30; 60; 90; 120; 180	15 (realizaram-se duplicados; a t = 180 min realizou-se apenas uma leitura)
28	30; 60; 120	10 (realizaram-se duplicados)
29		
30		
31		
32		
33		

Apenas na reacção de formação de **27b**, traçou-se um espectro de UV-Vis do meio reaccional diluído 1:100, antes de se ter adicionado **2** e após se ter terminado a irradiação.

Retirado o volume para a última quantificação dos grupos sulfidrilo em cada reacção, estas foram terminadas congelando-se a -20 °C.

2.10. Caracterização de proteínas

2.10.1. Electroforese em gel de poliacrilamida

Para avaliar o efeito das funcionalizações e das ligações intercadeia estabelecidas na estrutura quaternária, analisaram-se por SDS-PAGE e PAGE (géis de poliacrilamida 12,5% ou 15%) as proteínas **23** e **24**, assim como os produtos das reacções de formação de **26a** a **33** (inclusive as amostras **29.S**, **29.P**, **33.P** e **33.S** – a origem destas amostras encontra-se descrita na secção 2.10.4.). Nos géis SDS-PAGE, aplicaram-se as várias amostras tanto com tampão de amostras com β -mercaptoetanol, como com tampão de amostras sem β -mercaptoetanol. Nas amostras em que foi possível, normalizou-se a quantidade de proteína dodecamérica aplicada em 20 pmol.

A quantificação densitométrica em imagens digitais dos géis SDS-PAGE foi realizada utilizando o programa informático Fiji (*Fiji Is Just Image*)^{152–154} (as ferramentas e menus do programa utilizados passo a passo encontram-se descritos no Anexo V). Nos géis em que foi necessário, alinharam-se os perfis electroforéticos das amostras analisadas segundo uma linha segmentada, com 125 pixéis de largura, desde o poço de aplicação até quase ao fim do gel, passando pelo meio da largura de cada banda. Com as bandas direitas de cada gel, formou-se uma nova imagem e seleccionou-se uma secção rectangular, para cada perfil de separação, desde cerca do meio do gel de empacotamento até depois da última banda, englobando todas as bandas. Posteriormente, traçou-se o perfil de intensidade ao longo da secção rectangular e mediu-se a área por baixo da curva correspondente a cada banda do gel, após correcção da linha de base.

2.10.2. Determinação da actividade enzimática de oxidação de iões Fe^{2+} na presença de H_2O_2

A actividade enzimática das proteínas **23**, **24c**, **24h**, **26c**, **28** e **29** foi avalizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA¹⁵⁵. Para tal, dialisaram-se as proteínas pretendidas para tampão de ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 50 mM pH = 7,0, NaCl 50 mM, utilizando-se os dispositivos Slide-A-Lyzer MINI, em 1 L de tampão, a 4 °C, durante 2×1 h. Acertou-se a concentração das proteínas para 1 μM e o volume para 500 μL (0,5 nmol de proteína dodecamérica, 1 eq), traçando-se posteriormente o espectro de UV-Vis (com 4 ciclos).

À amostra de proteína na célula de quartzo, adicionou-se 0,2 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120,24 mM pH = 2,85 (24,0 nmol, ~48 eq) e 0,2 μL de H_2O_2 30% p/v, 100 vol. (1,76 μmol , $\sim 3,53 \times 10^3$ eq). Após o traçar do espectro de UV-Vis (com 4 ciclos), efectuaram-se três adições sucessivas de 0,2 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120,24 mM pH = 2,85 (24,0 nmol, ~48 eq), registando-se o

espectro entre cada adição. Repetiu-se este procedimento por mais três vezes (quatro no caso de **24h** e **28**).

A mesma experiência foi repetida numa solução controlo, sem proteína, com apenas 500 µL de tampão MOPS 50 mM pH = 7,0, NaCl 50 mM.

Calculou-se a média dos 4 ciclos de cada espectro, corrigiram-se as diluições efectuadas e, caso necessário, as alterações da linha de base. Posteriormente, subtraiu-se aos espectros obtidos após cada adição de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e Fe^{2+} o espectro do produto da reacção em análise antes de se ter efectuado a primeira adição.

2.10.3. MALDI-TOF MS

Para análise das proteínas **23**, **24c** e **26c** por MALDI-TOF MS, dialisou-se 26-60 µL das mesmas em 1 L de água ultrapura, a 4 °C, durante 2×1 h, utilizando-se os dispositivos Slide-A-Lyzer MINI. Posteriormente, traçaram-se os espectros de UV-Vis das soluções proteicas diluídas em 1:100 e determinaram-se as suas concentrações. A análise por MALDI-TOF MS foi efectuada imediatamente após a preparação das proteínas, em 50 µL de amostra a 50 µM com TFA 0,01% v/v.

2.10.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Para se traçarem os espectros de CD, preparou-se, de véspera, 300 µL das proteínas **29**, **30** e **33** a ~ 4 µM e congelou-se a -20 °C. Aquando das medições, uma vez que as amostras preparadas depositaram e não foi possível ressuspender-las no tampão em que se encontravam, centrifugou-se a amostra de **29** e a proteína **33** (solução mãe) a 10 000 *g*, à temperatura ambiente, durante 15 min, e ressuspenderam-se os péletes de **29** e **33** em, respectivamente, 300 µL e 500 µL de água ultrapura (**29.P** e **33.P**). Confirmou-se a concentração de **29.P**, de **33.P** e da amostra preparada de **30**, por espectrofotometria de UV-Vis, tendo-se determinado 2,2 µM, 1,4 µM e 3,5 µM, respectivamente.

Monitorizou-se a alteração dos espectros de CD em função da temperatura (designadas rampas de temperatura) para todas as amostras, excepto para a **33.P**, da qual apenas se traçou o espectro inicial.

Para se adquirirem os espectros de SRCD, centrifugou-se a proteína **29** (solução mãe) a 10 000 *g*, à temperatura ambiente, durante 15 min, ressuspendeu-se o pélete em 400 µL de água ultrapura (**29.P**) e preparou-se 300 µL deste a 4,0 µM. Preparou-se também 300 µL de **33.P** a 5,2 µM e de Dps a 2,7 µM em MOPS 50 mM pH = 7,0, NaF 50 mM.

Para a análise dos espectros, os valores de elipticidade, θ (m°), foram convertidos em elipticidade média por resíduo de aminoácido, $[\theta]_{\text{mrw}}$ (°cm²dmol⁻¹), assumindo-se a massa da

subunidade de **23** sem a *N*-formilmetionina inicial e o número de resíduos de aminoácidos correspondente para todas as amostras (17858,14 Da originados por 156 resíduos de aminoácidos)^{156,157}.

A partir dos espectros de SRCD da proteína Dps, de **29.P** e **33.P**, estimou-se a percentagem dos elementos de estrutura secundária que as constituem, utilizando-se o servidor *online* DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>)¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Optou-se pelo programa de análise CDSSTR, com o conjunto de dados de referência SP175 (otimizado para 190-240 nm)^{161,162}, por este fornecer o melhor ajuste aos dados experimentais (para todas as amostras, os valores dos desvios quadráticos médios normalizados, NRMSD, variaram entre 0,005 e 0,007).

A composição da estrutura secundária em hélices α e cadeias β , da proteína Dps, foi também estimada utilizando a ferramenta *online* Stride (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py>)¹⁶³ e a estrutura jm36-4_1a_refine_4 (resultados não publicados do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA).

2.10.5. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

Por forma a caracterizar as proteínas **23**, **29.P** e **33.P** por DLS, prepararam-se soluções de 1200 μ L a $\sim 2,5$ μ M.

Após as medições de DLS, incubou-se **29.P** e **33.P** com DTT 1 mM e mediram-se novamente os valores de DLS decorridos 5 min e 2 h.

No caso de **32**, centrifugou-se a 10 000 *g*, à temperatura ambiente, durante 15 min, e ressuspendeu-se o pélete em 400 μ L de água ultrapura. Diluiu-se 50 μ L deste 1:3 em água ultrapura e incubou-se com DTT 10 mM, durante 2 h, medindo-se posteriormente os valores de DLS num volume final de 1200 μ L ([**32**] = 2,6 μ M).

2.10.6. Microscopia de força atómica (AFM)

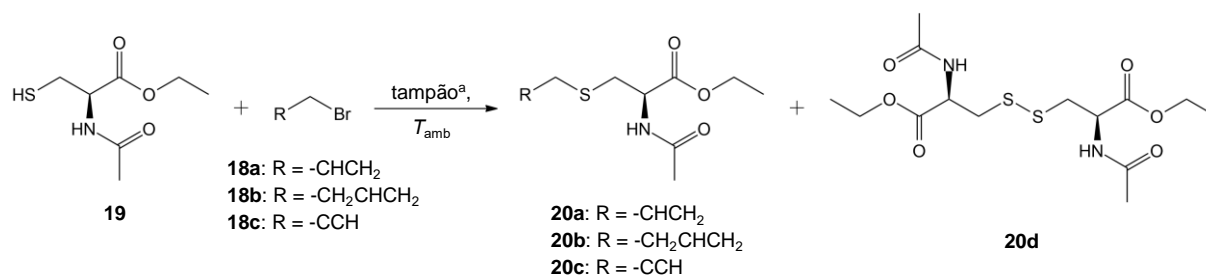
Diluíram-se as proteínas **23** (em tampão MOPS 50 mM pH = 7,0, NaCl 200 mM, DTT 1 mM), **26c**, **27b**, **29**, **29.P** e **33.P** para 100 nM nos tampões em que se encontravam e aplicou-se 125 μ L na superfície das micas. As proteínas **26c** e **29** reagidas com Fe^{2+} e H_2O_2 foram também analisadas por AFM, tendo sido preparadas da mesma forma.

3. Resultados e discussão

3.1. Síntese de *N*-acetil-*S*-alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)

O objectivo inicial do presente trabalho consistiu em testar, no aminoácido L-cisteína livre ou em derivados do mesmo, as condições experimentais das reacções de funcionalização e de acoplamento a aplicar posteriormente na proteína DpsT10C (**23**), de modo a formar estruturas proteicas supramoleculares artificiais.

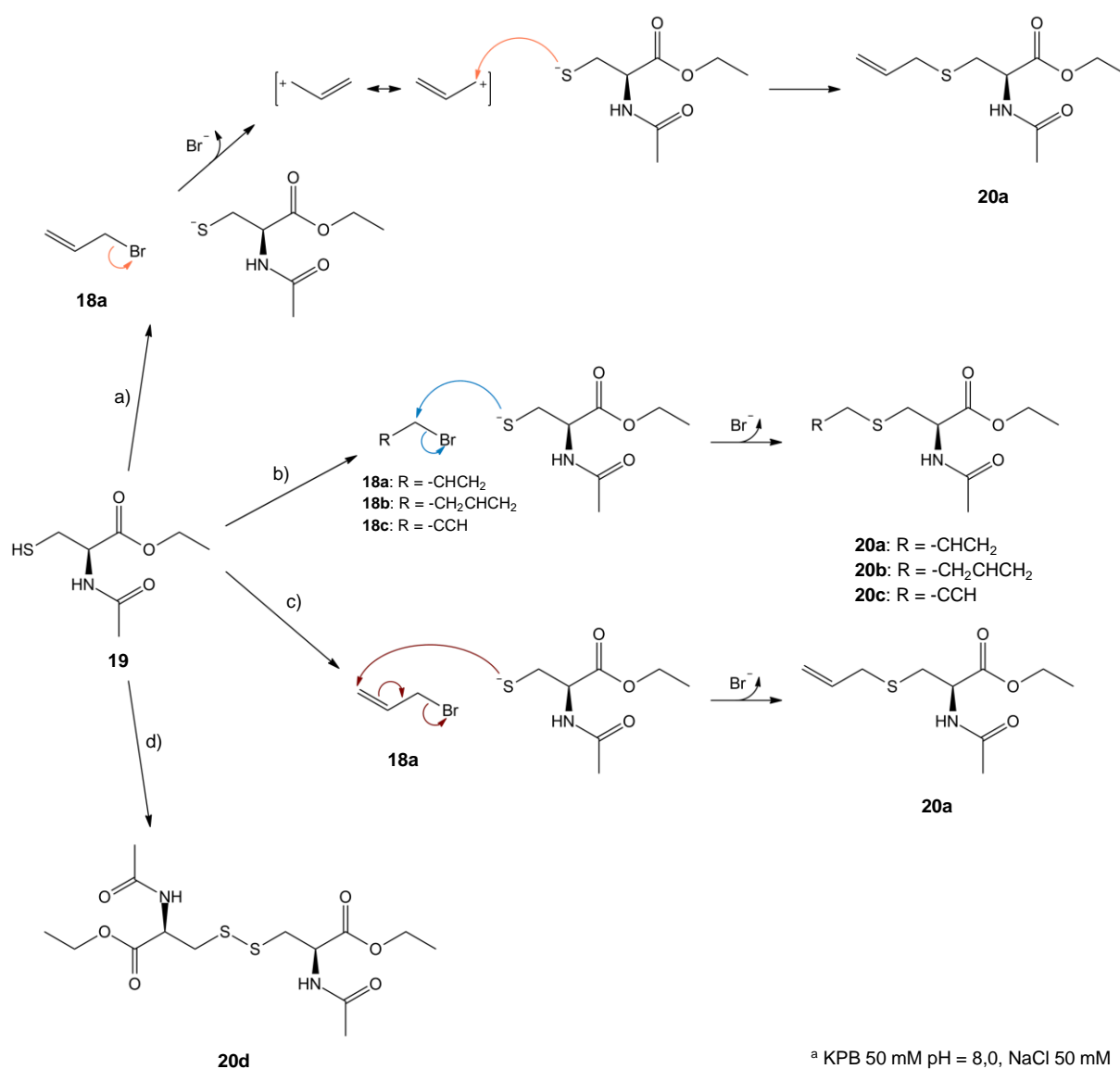
No caso das reacções de funcionalização de **19** com os reagentes alquilantes **18a** a **18c** (Esquema 3.1), estas foram realizadas em tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM desarejado para promover a desprotonação dos grupos sulfidrilo (possibilitando a sua actuação como nucleófilo nas reacções de substituição nucleofílica) e minimizar a sua oxidação.



^a KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM

Esquema 3.1 – Síntese de *N*-acetil-*S*-alil-L-cisteinato de etilo (**20a**) e compostos relacionados (**20b** a **20d**) a partir de *N*-acetil-L-cisteinato de etilo (**19**).

Utilizaram-se dois métodos semelhantes que diferiram principalmente no facto de se ter adicionado cerca de 67 vezes menos quantidade de reagente alquilante no método II do que no método I (1,6 eq vs 107 eq). No método I, pretendeu-se testar a reactividade dos reagentes nas condições pensadas para a proteína, enquanto no método II, quis-se isolar os compostos **20a** a **20d** e caracterizá-los por espectroscopia de IV e RMN. Os mecanismos propostos^{164–166} para a formação dos produtos **20a** a **20d** encontram-se apresentados no Esquema 3.2.



Esquema 3.2 – Síntese de *N*-acetil-*S*-alil-*L*-cisteinato de etilo (**20a**) e compostos relacionados (**20b** a **20d**) através das reacções S_N1 (**a**) **18a**, KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM; setas cor-de-laranja), S_N2 (**b**) **18a**, **18b** ou **18c**, KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM; setas azuis), S_N2' (**c**) **18a**, KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM; setas vermelhas) e da reacção de oxidação (**d**) reacção paralela que pode ocorrer nas condições experimentais referidas).

Uma vez que as reacções realizadas com a proteína **23** não podem ser seguidas por cromatografia em camada fina, optou-se por monitorizar o desaparecimento dos grupos sulfidrilo utilizando um método colorimétrico envolvendo o reagente de Ellman¹⁵⁰ (todos os valores envolvidos nas quantificações dos grupos sulfidrilo são apresentados no Anexo VI.1). Este método não é perturbado pela presença dos reagentes alquilantes **18a** a **18c** (Tabela VI.2).

O tempo reaccional decorrido até se verificar >95% de grupos reagidos nas reacções de síntese de **20a**, **20b** e **20c**, pelos métodos I e II, encontra-se indicado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Tempo reaccional a que se verificou um desaparecimento dos grupos sulfidrilo >95% nas reacções de síntese dos produtos **20a** a **20c**.

Produto	Tempo reaccional a que se verificou um desaparecimento dos grupos sulfidrilo >95%	
	Método I	Método II
20a	10 min	10 min
20b	15 h 45 min	5 d 1 h 36 min ^a
20c	10 min	90 min

^a Atingiu-se, no máximo, 77,3% de grupos sulfidrilo reagidos.

Como se pode observar pela tabela, a diminuição do número de equivalentes de reagente alquilante no método II levou a um aumento do tempo reaccional nas sínteses de **20b** e **20c**, terminando primeiro a reacção de formação de **20a**, seguida de **20c** e, por fim, de **20b**. A maior reactividade na formação de **20a** pode ser explicada por o reagente **18a** poder reagir pelos mecanismos S_N1 , S_N2 e S_N2' (reacção S_N2 com rearranjo do grupo alilo)¹⁶⁴, contrariamente aos reagentes **18b** e **18c** cujo mecanismo S_N1 não é favorável e S_N2' não é possível^{164,165}. Por sua vez, **18b** é menos reactivo do que **18c** em reacções S_N2 por o estado de transição gerado não poder ser estabilizado por ressonância e por as interacções electrostática estabelecidas entre a carga parcial positiva no átomo de carbono β e as cargas parciais negativas no grupo de saída e nucleófilo serem repulsivas (por analogia com compostos halogenetos de propilo)¹⁶⁷.

Os sinais dos espectros de IV e RMN característicos dos compostos obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Principais sinais dos espectros de IV e RMN dos compostos **20a** a **20d**.

Produto	Espectroscopia de IV ($\tilde{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}) ^a	Espectroscopia de ^1H -RMN (400,1 MHz, CDCl_3) (δ , ppm) ^b	Espectroscopia de ^{13}C -RMN (100,6 MHz, CDCl_3) (δ , ppm)
20a	1738 (mf, ν C=O) 1654 (mf, amida I – ν C=O) 1532 (f, amida II – δ N-H/ ν C-N) 1204 (mf, ν_{as} C-O-C) 1183 (mf, ν_{as} C-O-C) 1129 (f, ν_{s} C-O-C) 992 (md, δ_{ip} =CH-) 920 (md, δ_{ip} =CH ₂)	5,831-5,673 (1H, m, =CH-) 5,179-5,079 (2H, m, =CH ₂) 4,271-4,172 (2H, m, OCH_2CH_3) 3,130 (2H, d, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{S}$) 1,302 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, OCH_2CH_3)	171,03 (C=O) 169,89 (C=O) 133,71 (=CH-) 117,95 (=CH ₂) 61,92 (OCH_2CH_3) 35,27 ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{S}$) 14,22 (OCH_2CH_3)
20b	1739 (mf, ν C=O) 1655 (mf, amida I – ν C=O) 1533 (f, amida II – δ N-H/ ν C-N) 1206 (mf, ν_{as} C-O-C) 1130 (f, ν_{s} C-O-C) 918 (md, δ_{ip} =CH ₂)	-	-
20c	3438-3139 (fr, ν NH/ \equiv CH) 1736 (mf, ν C=O) 1652 (mf, amida I – ν C=O) 1532 (f, amida II – δ N-H/ ν C-N) 1208 (mf, ν_{as} C-O-C) 1129 (f, ν_{s} C-O-C) 700-600 (md, δ \equiv CH)	4,307-4,166 (2H, m, OCH_2CH_3) 3,406-3,173 (3H, m, CHCCCH_2S e (C-3)H) 2,303 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, \equiv CH) 1,350-1,273 (3H, m, OCH_2CH_3)	170,92 (C=O) 170,04 (C=O) 79,37 (\equiv C-) 72,05 (\equiv CH) 62,10 (OCH_2CH_3) 19,98 (CHCCCH_2S) 14,22 (OCH_2CH_3)

Produto	Espectroscopia de IV ($\tilde{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}) ^a	Espectroscopia de ^1H -RMN (400,1 MHz, CDCl_3) (δ , ppm) ^b	Espectroscopia de ^{13}C -RMN (100,6 MHz, CDCl_3) (δ , ppm)
20d	1737 (mf, ν C=O) 1651 (mf, amida I – ν C=O) 1526 (mf, amida II – δ N-H/ ν C-N) 1196 (mf, ν_{as} C-O-C) 1129 (f, ν_{s} C-O-C)	4,271-4,172 (4H, m, OCH_2CH_3) 1,302 (6H, t, $J = 7,1$ Hz, OCH_2CH_3)	170,31 (C=O) 170,02 (C=O) 62,11 (OCH_2CH_3) 14,16 (OCH_2CH_3)

^a mf: muito forte; f: forte; md: média; fr: fraca; ν : vibração de estiramento (*stretching*); δ : vibração de deformação (*bending*); s: simétrico; as: assimétrico; fp: fora do plano

^b d: duplete; m: multiplete; t: tripleto

O espectro de ^1H -RMN de **20a** apresenta dois multipletos a 5,831-5,673 ppm e 5,179-5,079 ppm correspondentes aos sinais de $=\text{CH}-$ e $=\text{CH}_2$, respectivamente¹⁶⁸. No caso do espectro de ^{13}C -RMN, os desvios químicos dos carbonos referidos encontram-se a 133,71 ppm e 117,95 ppm¹⁶⁸. A presença da ligação dupla C=C pode ser constatada, no espectro de IV, pela ausência da vibração de estiramento da ligação S-H¹⁶⁹⁻¹⁷¹, presente a 2565 cm^{-1} no espectro do material de partida **19** (Anexo VII, Figura VII.1), e pelas vibrações de deformação fora do plano de $=\text{CH}$ -^{171,172}, a 992 cm^{-1} , e de $=\text{CH}_2$ ^{171,172}, a 920 cm^{-1} .

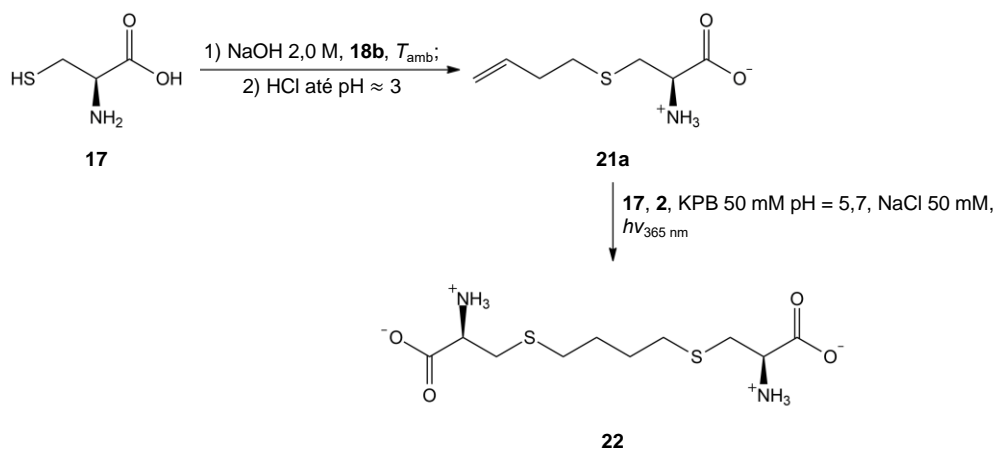
No composto **20c**, os sinais de RMN gerados pelo protão metino de $\equiv\text{CH}$ e pelos carbonos $\equiv\text{C}-$ e $\equiv\text{CH}$ ¹⁷³ encontram-se, respectivamente, a 2,303 ppm (tripleto, $J = 2,5$ Hz), 79,37 ppm e 72,05 ppm. Apesar de não ser possível observar nenhuma banda evidente da adição da ligação tripla, no espectro de IV, a banda de vibração de estiramento de S-H deixa de ser visível e as bandas nos intervalos de 3438 cm^{-1} a 3139 cm^{-1} (correspondente à zona de vibração de estiramento de $\equiv\text{C-H}$ ^{171,172}) e 700 cm^{-1} a 600 cm^{-1} (gama de vibração de deformação de $\equiv\text{C-H}$ ^{171,172}) tornam-se mais intensas.

Tanto nos espectros de RMN de **20a** como de **20c** foi possível encontrar sinais correspondentes a um outro composto, com um número aparente de sete átomos de carbono e desvios químicos semelhantes aos dos produtos referidos. Uma vez que não é possível observar nenhuma banda correspondente à vibração de estiramento da ligação S-H, nos espectros de IV de ambos os compostos, e que as percentagens de grupos sulfidrílo reagidos ultrapassaram o valor de 98%, este composto não poderá ser material de partida **19** por reagir, mas muito provavelmente o produto resultante da sua dimerização, **20d**.

No caso da reacção de formação de **20b**, tendo esta sido consideravelmente mais lenta do que as de **20a** e **20c**, pôde ocorrer maior formação de **20d**, permitindo que este cristalizasse selectivamente. A baixa reactividade de **18b** e a formação do produto secundário **20d** justificam o baixo rendimento obtido para **20b** (2,12 mg). A formação deste composto é suportada, no espectro de IV, pela ausência da banda de estiramento da ligação S-H (a 2565 cm^{-1}) e pela observação de uma banda de deformação fora do plano de $=\text{CH}_2$ ^{171,172}, a 918 cm^{-1} .

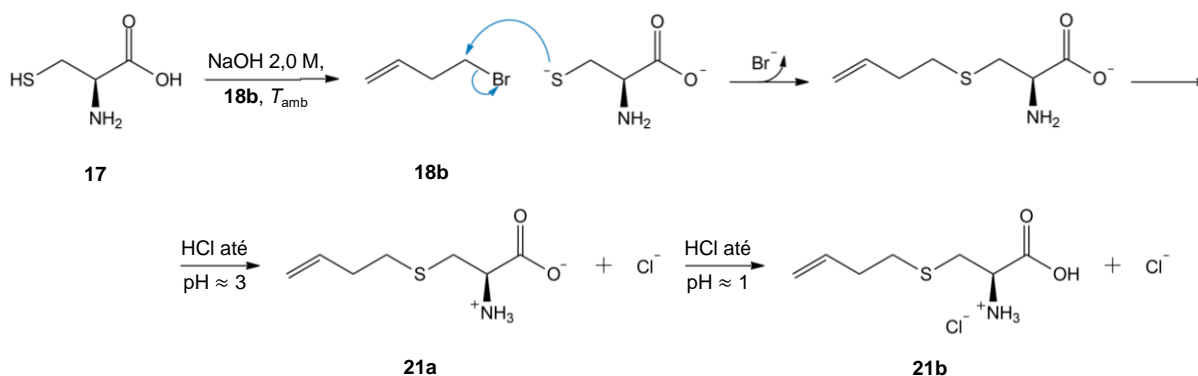
3.2. Acoplamento de L-cisteína (17) e S-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a)

De modo a analisar a eficiência das reacções de homólise do fotoiniciador **2** e de acoplamento tiol-eno no tampão pretendido (KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM), acoplaram-se os compostos L-cisteína (**17**) e S-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (**21**), formando o composto (2*R*,2'*R*)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (**22**) (Esquema 3.3).



Esquema 3.3 – Síntese de (2*R*,2'*R*)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (**22**) a partir de L-cisteína (**17**).

O composto **21** foi preparado a partir do composto **17** e do reagente alquilante **18b** de acordo com o procedimento de K. Sharma, *et al.*¹⁵¹, encontrando-se o mecanismo reaccional proposto apresentado no Esquema 3.4 e a caracterização dos produtos obtidos na Tabela 3.3.



Esquema 3.4 – Mecanismo S_N2 da reacção de síntese de S-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (**21**) sob a forma de (*R*)-2-amónio-3-(but-3-en-1-iltio)propanoato (**21a**) e cloreto de (*R*)-2-(but-3-en-1-iltio)-1-carboxietan-1-amínio (**21b**).

Tabela 3.3 – Principais sinais dos espectros de IV e RMN dos compostos **21a**, **21b** e **22**.

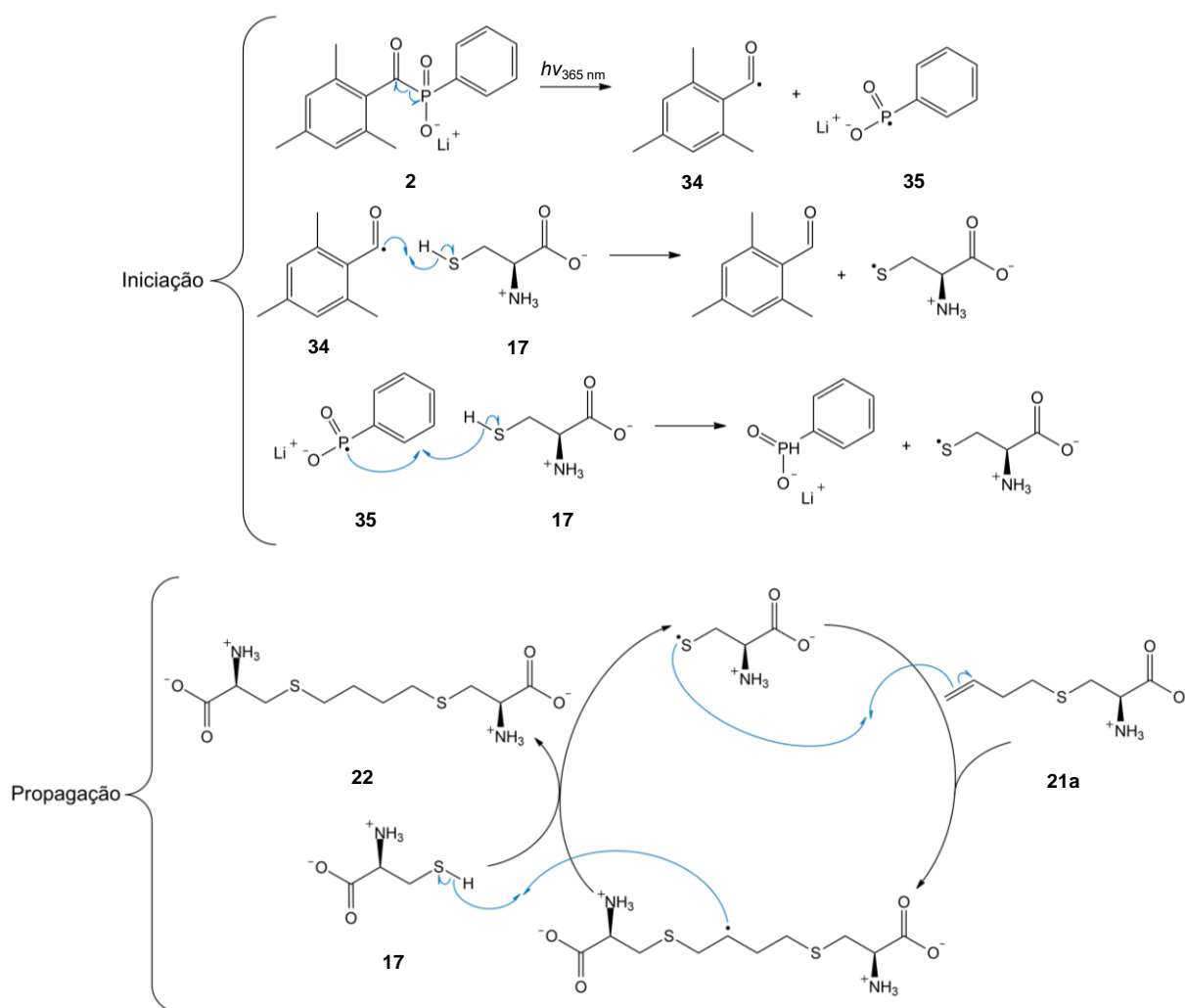
Produto	Espectroscopia de IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}) ^a	Espectroscopia de ¹ H-RMN (400,1 MHz, D ₂ O ^b) (δ , ppm) ^c	Espectroscopia de ¹³ C-RMN (100,6 MHz, D ₂ O ^b) (δ , ppm)
21a	1618 (md, δ_{as} NH ₃ ⁺) 1578 (mf, ν_{as} COO ⁻) 1483 (mf, δ_{s} NH ₃ ⁺) 1410 (mf, ν_{s} COO ⁻) 1390 (f, ν_{s} COO ⁻) 915 (f, δ_{ip} =CH ₂) 848 (f, δ_{ip} =CH ₂) 611 (md, δ_{np} COO ⁻) 540 (f, δ_{ip} COO ⁻) 454 (md, δ_{np} COO ⁻).	5,960-5,830 (1H, m, =CH-) 5,170 (1H, d, J = 17,3 Hz, =CH _{trans}) 5,111 (1H, d, J = 10,2 Hz, =CH _{cis}) 2,721 (2H, t, J = 7,1 Hz, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ S) 2,397 (2H, dt, J = 7,1 e 6,4 Hz, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ S)	172,70 (C=O) 136,98 (=CH-) 116,28 (=CH ₂) 32,77 (CH ₂) 30,62 (CH ₂)
21b	1725 (mf, ν C=O) 1640 (fr, ν C=C) 1584 (md, δ_{as} NH ₃ ⁺) 1490 (mf, δ_{s} NH ₃ ⁺) 819 (mf, δ_{ip} =CH ₂)	5,950-5,808 (1H, m, =CH-) 5,153 (1H, d, J = 17,4 Hz, =CH _{trans}) 5,099 (1H, d, J = 10,2 Hz, =CH _{cis}) 2,720 (2H, t, J = 7,1 Hz, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ S) 2,386 (2H, dt, J = 7,1 e 6,4 Hz, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ S)	170,85 (C=O) 136,85 (=CH-) 116,36 (=CH ₂) 32,74 (CH ₂) 30,83 (CH ₂)
22	1588 (mf, ν_{as} COO ⁻) 1417 (f, ν_{s} COO ⁻) 530 (mf, δ_{ip} COO ⁻)	2,103-1,928 (4H, m, SCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ S) 1,128-0,979 (4H, m, SCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ S)	169,93 (C=O) 30,68 (SCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ S) 27,01 (SCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ S)

^a mf: muito forte; f: forte; md: média; fr: fraca; ν : vibração de estiramento (*stretching*); δ : vibração de deformação (*bending*); s: simétrico; as: assimétrico; np: no plano; fp: fora do plano

^b D₂O + DCl no caso de **22**

^c d: duplete; dt: duplete de tripletos; m: multiplete; t: tripleto

Por sua vez, as condições reaccionais do acoplamento tiol-eno entre **17** e **21** foram baseadas nas publicadas por E. M. Valkevich, *et al.*⁸⁵, tendo-se substituído o tampão acetato de sódio 250 mM pH = 5,1 por KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM (mais favorável à proteína **23**) e aumentado o volume reaccional (de 50 μ L para 1150 μ L), assim como a concentração dos grupos a reagir (de 1 mM para 89 mM), de modo a obter quantidade suficiente de produto para poder caracterizá-lo por espectroscopia de IV e RMN (Tabela 3.3). Parte do mecanismo do acoplamento tiol-eno realizado^{85,88,174,175} é apresentado no Esquema 3.5.



Esquema 3.5 – Passos de iniciação e propagação do mecanismo da reação radicalar de síntese de (2*R*,2'*R*)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (**22**).

Nos espectros de ^1H -RMN de **21a** e **21b**, os dois multipletos a, respectivamente, 5,960-5,830 ppm e 5,950-5,808 ppm são causados pelo próton $=\text{CH}$ ^{151,168}, enquanto os dupletos centrados a 5,170 ppm ($J = 17,3$ Hz) e 5,111 ppm ($J = 10,2$ Hz), no espectro de **21a**, e a 5,153 ppm ($J = 17,4$ Hz) e 5,099 ppm ($J = 10,2$ Hz), no espectro de **21b**, são gerados pelos prótons $=\text{CH}_2$ ^{151,168}. Por sua vez, os prótons metílenos $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ e $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ^{151,168} são responsáveis, respectivamente, pelo aparecimento dos sinais triplete a 2,721 ppm ($J = 7,1$ Hz) e duplete de tripletos a 2,397 ppm ($J = 7,1$ e 6,4 Hz), no espectro de **21a** (no espectro de **21b**, os mesmos sinais aparecem a 2,720 ppm, com $J = 7,1$ Hz, e a 2,386 ppm, com $J = 7,1$ e 6,4 Hz). No caso dos espectros de ^{13}C -RMN, os carbonos $=\text{CH}$ - e $=\text{CH}_2$ ^{151,168} geram, por essa ordem, os sinais a 136,98 ppm e 116,28 ppm, no espectro de **21a**, e 136,85 ppm e 116,36 ppm, no espectro de **21b**, enquanto os sinais dos carbonos $-\text{CH}_2-$ do grupo but-3-en-1-il aparecem a 32,77 ppm e 30,62 ppm, para **21a**, e 32,74 ppm e 30,83 ppm, para **21b**.

Nos espectros de IV dos compostos **21a** e **21b**, é possível constatar a ausência do sinal a 2551 cm^{-1} , presente no espectro do material de partida **17** (Anexo VII, Figura VII.2) e gerado pela vibração de estiramento da ligação S-H¹⁶⁹⁻¹⁷¹. As vibrações de deformação fora do plano dos prótons $=\text{CH}_2$ ^{171,172} originam os sinais a 915 cm^{-1} e 848 cm^{-1} , no espectro de **21a**, e a 919 cm^{-1} e 819 cm^{-1} , no espectro de **21b**. Neste último, é ainda possível observar o sinal produzido pela vibração de estiramento de C=C^{171,172}, a 1640 cm^{-1} .

Pela análise dos espectros de RMN e de IV, verifica-se que a reacção foi quimiosselectiva, pois apenas o grupo tiolato foi derivatizado.

As diferenças observáveis entre os espectros de IV de **21a** e **21b** devem-se ao facto de os produtos terem precipitado a pH diferentes (**21a** precipitou a $\text{pH} \approx 3$, enquanto **21b** precipitou a $\text{pH} \approx 1$). Inicialmente, a $\text{pH} \approx 3$, o composto **21** precipitou na sua forma zwitteriônica (**21a**, sendo esta a forma descrita na literatura¹⁵¹), originando o grupo carboxilato duas bandas de forte intensidade características das vibrações de estiramento assimétrica (1578 cm^{-1}) e simétrica (1410 cm^{-1} e 1390 cm^{-1})^{171,172}. Por sua vez, a pH mais baixo, **21** precipitou sob a forma de hidro-halogeneto (provavelmente, cloreto) (**21b**), dando os sinais gerados pelo grupo carboxilato mencionados anteriormente lugar aos sinais de estiramento das ligações C=O (1725 cm^{-1}) e C-O (1225 cm^{-1} e 1196 cm^{-1})^{171,172}.

A ocorrência da reacção de formação de **22** pelo acoplamento de **17** e **21a** foi comprovada, nos espectros de RMN e IV, pelo desaparecimentos dos sinais resultantes da ligação dupla de **21a** (o multiplete a 5,960-5,830 ppm e o duplete a 5,170 ppm, no espectro de ^1H -RMN; os sinais a 136,98 ppm e 116,28 ppm, no espectro de ^{13}C -RMN; e os sinais a 915 cm^{-1} e 848 cm^{-1} , no espectro de IV) nos espectros de **22**.

Possuindo o composto **22** o eixo de simetria C_2 assinalado na Figura 3.1, este composto é resultante da adição anti-Markovnikov do radical tiil à ligação dupla, não se verificando nenhuma reacção paralela de adição à ligação dupla de um dos fragmentos radicalares de LAP gerados (radicais 2,4,6-trimetilbenzoil, **34**, e fenilfosfinato de lítio, **35**)^{85,174}.

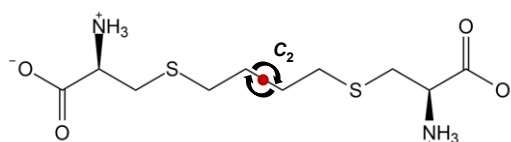


Figura 3.1 - Estrutura do composto (2*R*,2'*R*)-3,3'-(butano-1,4-diilbis(sulfanodiil))bis(2-amoniopropanoato) (**22**) com o eixo de simetria C_2 assinalado a vermelho.

3.3. Produção e purificação de DpsT10C (23)

Comprovada a eficácia das reacções de funcionalização com **18** e do acoplamento tiol-eno no aminoácido L-cisteína e seus derivados, procedeu-se à sua aplicação na proteína **23**. Para tal, a proteína **23** foi inicialmente sobreexpressa em células de *E. coli* BL21(DE3) em meio de cultura LB com indução da expressão com IPTG 1 mM, tendo-se obtido um rendimento celular de 3,4 g de células (peso húmido) por litro de cultura.

Após lise, o fraccionamento celular, realizado por centrifugações diferenciais, foi analisado por SDS-PAGE (Figura 3.2).

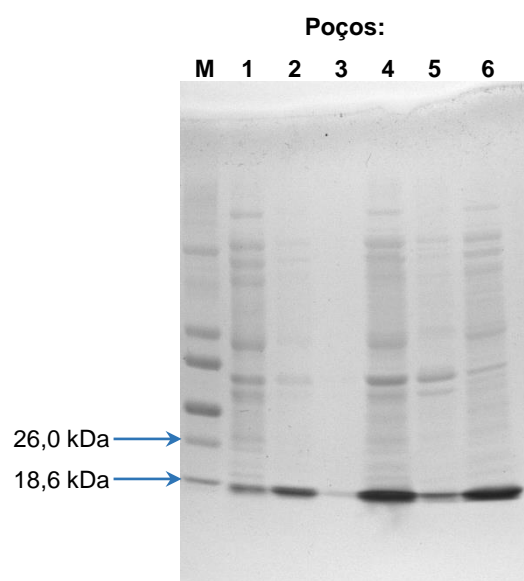


Figura 3.2 – Análise do perfil de produção proteica e fraccionamento celular por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%). M – Marcador de massas moleculares LMW; 1 – Amostra antes da indução da expressão da proteína ($t = 0$ h); 2 – Amostra após indução da expressão da proteína ($t = 3$ h); 3 – Pélete da centrifugação a baixa velocidade; 4 – Sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; 5 – Pélete da ultracentrifugação; 6 – Sobrenadante da ultracentrifugação. Aplicou-se 5 μ L de marcador e 8 μ L de cada amostra (normalizada).

Da análise da Figura 3.2, conclui-se que a proteína foi produzida na forma solúvel, encontrando-se maioritariamente nas fracções dos sobrenadantes dos passos de centrifugação (poços 4 e 6).

O sobrenadante da ultracentrifugação foi posteriormente aplicado numa coluna cromatográfica de permuta iónica com resina aniónica preparativa, de modo a purificar a proteína **23**. A eluição dos componentes adsorvidos à coluna foi realizada com um gradiente linear descontínuo de tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM), sendo o cromatograma apresentado na Figura 3.3.

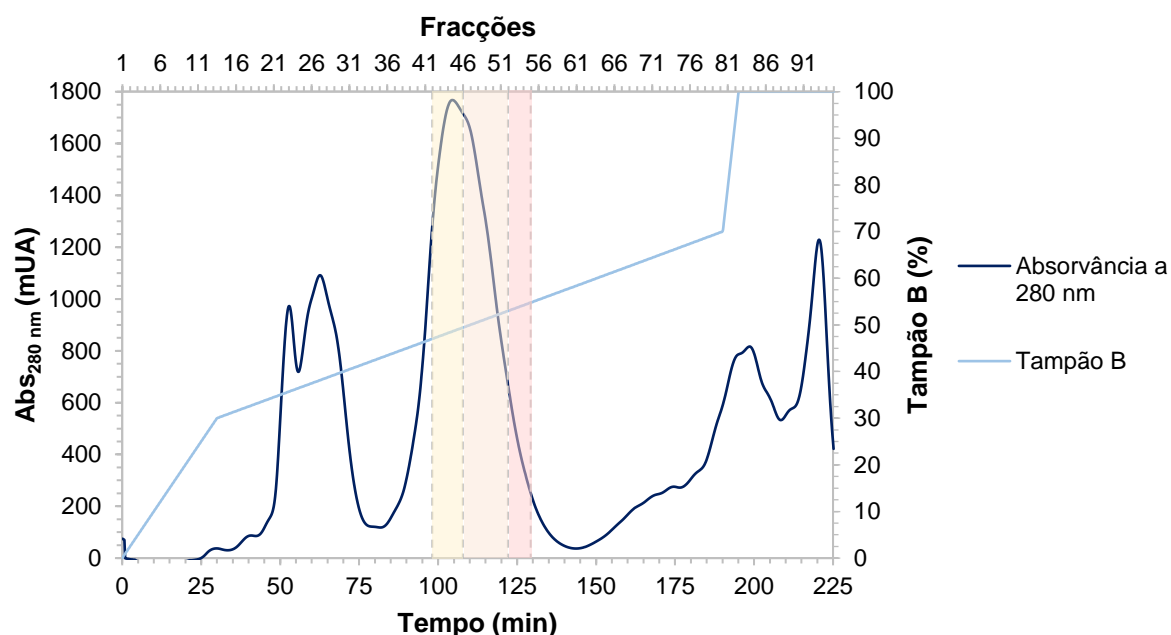


Figura 3.3 – Cromatograma do passo de purificação do sobrenadante da ultracentrifugação em coluna DEAE *Sepharose™ Fast Flow*, eluída com tampão B (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl 500 mM, DTT 1 mM), com um caudal de 5 mL/min (linha a azul claro), monitorizando a absorvância a 280 nm (linha a azul escuro). No topo do cromatograma é apresentada a numeração das fracções recolhidas ao longo do processo cromatográfico.

A eficiência do passo cromatográfico foi avaliada por SDS-PAGE, encontrando-se os géis realizados na Figura 3.4.

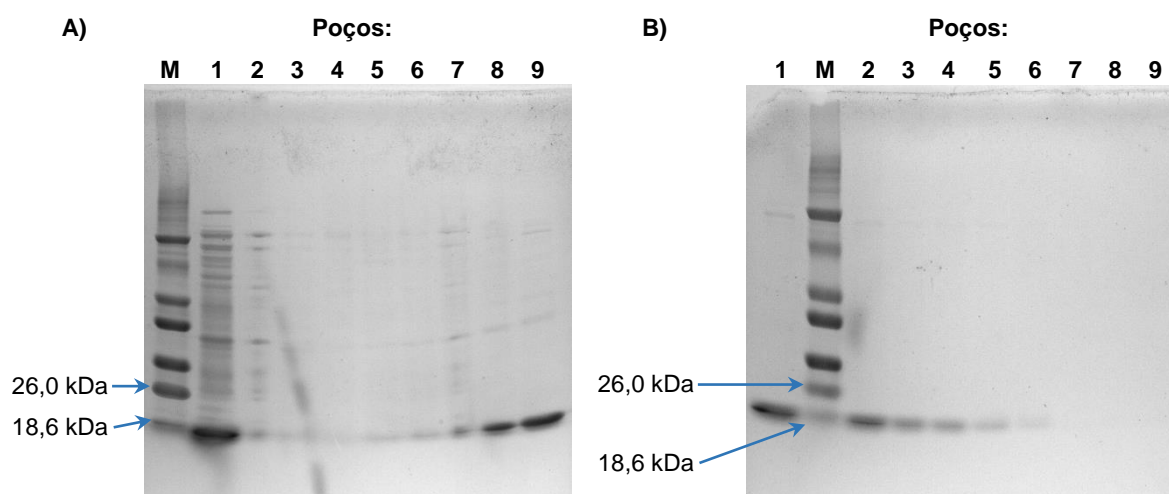


Figura 3.4 – Avaliação da eficiência do passo cromatográfico em coluna DEAE *Sepharose™ Fast Flow* por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%) para purificação da proteína DpsT10C. **A)** 1 – Sobrenadante da ultracentrifugação aplicado na coluna cromatográfica (8 µL de uma diluição 9:59); 2 – Fracção recolhida no passo de lavagem da coluna com tampão A (Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, DTT 1 mM) (15 µL); 3 a 9 – Fracções 23, 28, 36, 38, 40, 42 e 44, respectivamente (2 µL de uma diluição 1:5). **B)** 1 a 9 – Fracções 46, 48, 50, 52, 54, 56, 77, 82 e 92 respectivamente (2 µL de uma diluição 1:5). M – Marcador de massas moleculares LMW (5 µL).

Com base no cromatograma (Figura 3.3) e no perfil electroforético (Figura 3.4), foi possível juntar as fracções 42 a 45 (fracção global I), 46 a 51 (fracção global II) e 52 a 54 (fracção global III) – assinaladas no cromatograma – e concentrá-las posteriormente.

De modo a analisar o processo de concentração das fracções globais de **23** e a determinar as suas concentrações, traçaram-se os seus espectros de UV-Vis (Figura 3.5) e aplicaram-se as três fracções num gel SDS-PAGE (Figura 3.6).

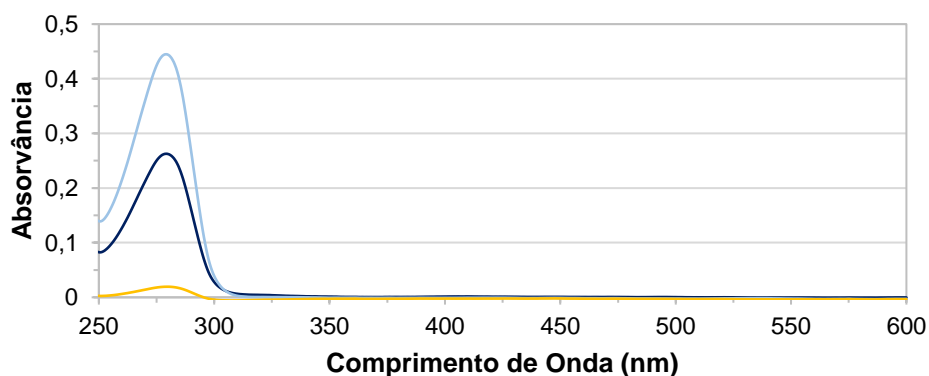


Figura 3.5 – Espectros de UV-Vis das fracções globais I (linha a azul escuro) e II (linha a azul claro) após concentração (Vivacell 70, 5 kDa MWCO) e da fracção global III (linha a amarelo), diluídas 1:100.

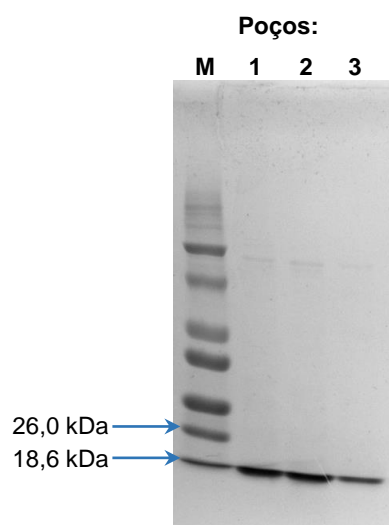


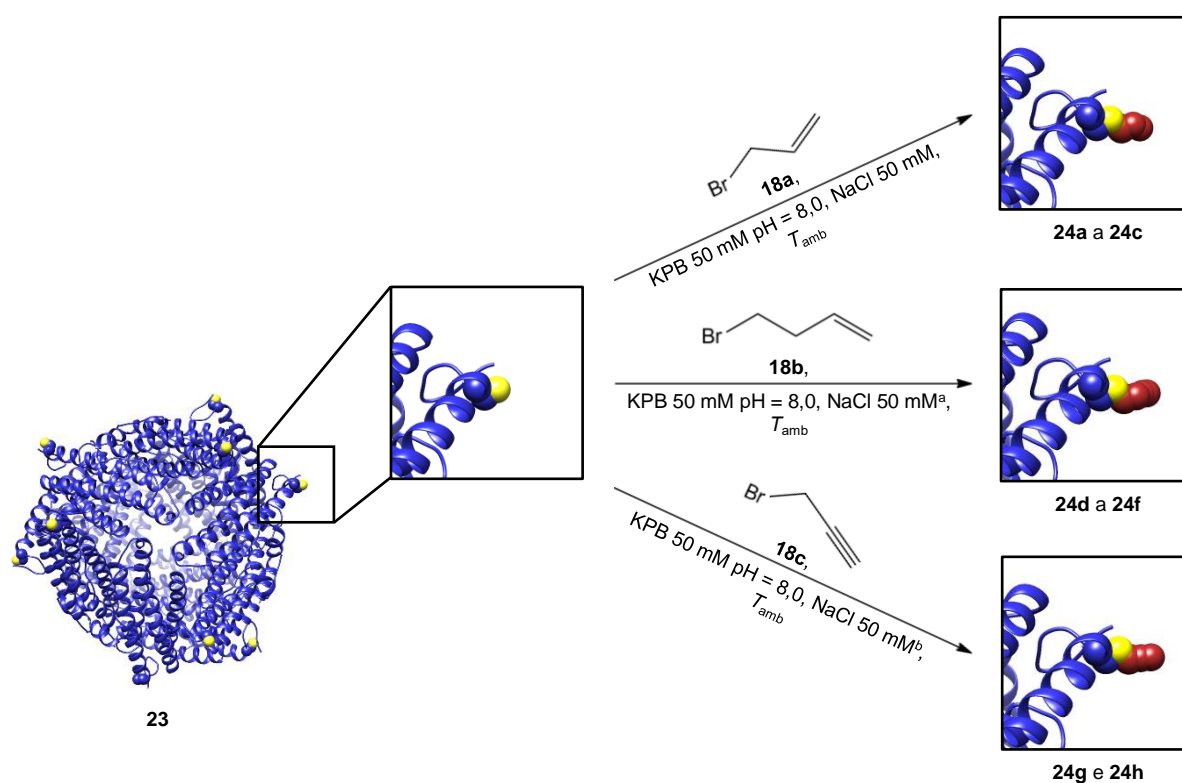
Figura 3.6 – Análise das fracções globais de proteína DpsT10C purificada por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%). M – Marcador de massas moleculares LMW (5 μ L); 1 – Fracção global I concentrada (0,5 μ L); 2 – Fracção global II concentrada (0,5 μ L); 3 – Fracção global III (1 μ L).

As fracções globais I a III apresentaram uma concentração final de, respectivamente, 89,5 μ M (~22 mL), 151,5 μ M (~20 mL) e 6,64 μ M (~36 mL), o que corresponde a um rendimento de ~282,7 mg de proteína **23** por litro de cultura. Para os estudos posteriores, utilizaram-se as fracções globais I e II por estas se encontrarem mais concentradas.

Devido à ausência de uma banda alargada nos espectros de UV-Vis (Figura 3.5), na gama 310-420 nm e causada pela absorção de óxidos de ferro férrico^{155,176}, pode concluir-se que a proteína foi purificada na sua forma apo (sem ferro).

3.4. Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)

Tendo-se sobreexpresso e purificado a proteína **23**, pretendeu-se modificá-la quimicamente nos resíduos de L-cisteína, na posição 10 de cada cadeia polipeptídica (12 cadeias idênticas no total), com cadeias alquílicas com diferentes comprimentos (três ou quatro átomos de carbono) e ligações múltiplas (uma ligação dupla ou tripla), encontrando-se as reacções apresentadas no Esquema 3.6 (os mecanismos reaccionais são idênticos aos apresentados no Esquema 3.2).



^a KPB 50 mM pH = 8,0, KI 50 mM para a formação de **24e** e **24f**

^b KPB 50 mM pH = 8,0, KI 50 mM para a formação de **24h**

Esquema 3.6 – Funcionalização dos resíduos de L-cisteína de DpsT10C (**23**). Para simplificação, as reacções são apresentadas apenas num dos resíduos de L-cisteína das 12 subunidades da molécula. Os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína e as cadeias alquílicas introduzidas com as reacções estão destacados a amarelo e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados. Estrutura cristalográfica não publicada do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA.

Tal como no caso das reacções de derivatização de **19**, também a evolução das reacções de funcionalização de **23** foi avaliada através da quantificação do número de grupos sulfidrílo por molécula de **23** (Figura 3.7 – todos os valores envolvidos nas quantificações dos grupos encontram-se apresentados no Anexo VI.2).

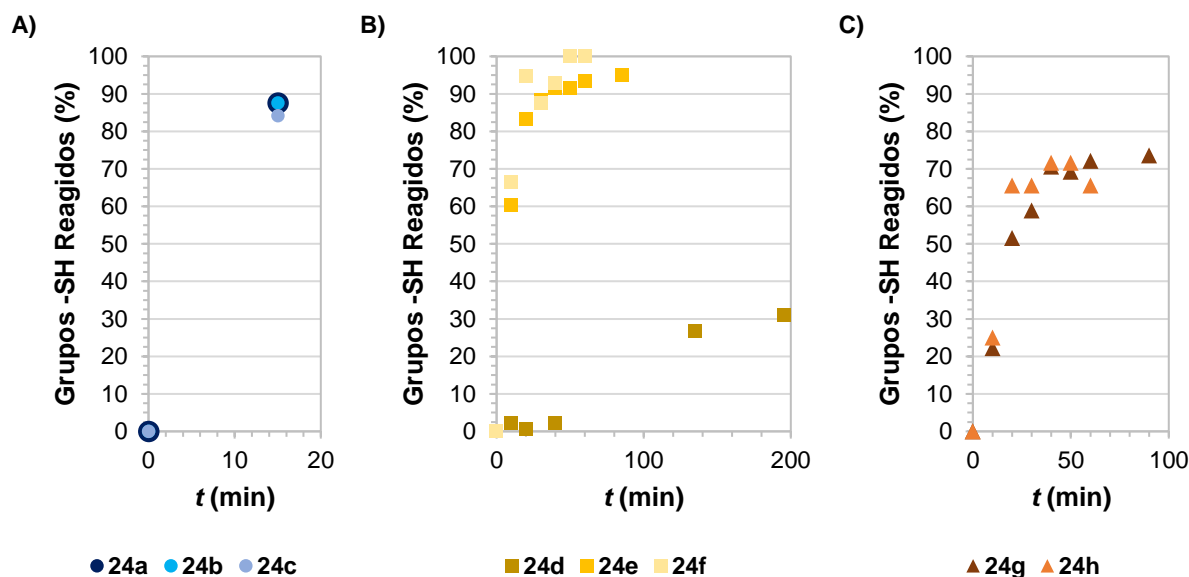


Figura 3.7 – Monitorização das reacções de funcionalização da proteína DpsT10C (**23**), através da quantificação dos grupos sulfidrílo, com: **A)** 3-bromoprop-1-eno (**18a**) (bioconjugados **24a** a **24c**), **B)** 4-bromobut-1-eno (**18b**) (proteínas funcionalizadas **24d** a **24f**) e **C)** 3-bromoprop-1-eno (**18c**) (proteínas **24g** e **24h**).

À semelhança do que se pôde observar nas reacções de derivatização de **19**, também no caso de **23** as reacções que, nas mesmas condições (tampão KPB 50 mM pH = 8,0, NaCl 50 mM e um excesso de 111 eq de reagente alquilante), terminaram primeiro tinham como reagente bromado **18a** (reacções de formação de **24a** a **24c**), seguindo-se a reacção com **18c** (síntese de **24g**) e por fim a com **18b** (reacção de formação de **24d**).

A média das quantificações dos grupos sulfidrílo, a $t = 0$ min, foi igual a $10,8 \pm 1,4$, pelo que a incubação com DTT 10 mM, durante 2 h, à temperatura ambiente possibilita que todos os grupos sulfidrílo de **23** (num total de 12) estejam disponíveis para serem funcionalizados.

As reacções com **18a** (bioconjugados **24a** a **24c**, Figura 3.7 – A) comportaram-se todas de modo semelhante, atingindo-se praticamente 90% de grupos reagidos ao fim de 15 min ($[-SH]/[23]_{\text{média}} = 1,4$).

Nas reacções com **18b** (Figura 3.7 – B), foi necessário aumentar a quantidade de reagente bromado em cerca de 9 vezes e alterar o sal do tampão de NaCl para KI por forma a que a reacção ocorresse no intervalo de tempo pretendido de 1 h (reacções de formação de **24e** e **24f**). Mantendo-se o excesso de 111 eq (na síntese de **24d**), a diminuição do número de grupos

sulfidrilo, em 40 min, foi de ~2%; e a adição de 1099 eq de **18b** levou apenas a uma redução de mais ~29% do número de grupos em 2 h. A alteração do sal do tampão da reacção para KI permitiu que o número de grupos sulfidrilo diminuísse em 95/100% (**24e/24f**) devido ao facto de o ião I^- activar o reagente alquilante por troca do átomo de halogénio, catalisando assim a reacção^{177,178}. Sendo o ião I^- um bom nucleófilo, este irá, em primeiro lugar, actuar como nucleófilo e substituir o átomo de bromo no reagente alquilante. Em segundo lugar, I^- irá actuar como grupo de saída, acelerando a reacção com o ião tiolato por ser melhor grupo de saída do que Br^- .

Nas modificações químicas com **18c** (Figura 3.7 – C), a reacção realizada em tampão com NaCl (síntese de **24g**) e a reacção realizada em tampão com KI (síntese de **24h**) progrediram de forma semelhante (ao fim de 60 min, a redução do número de grupos sulfidrilo foi de 72,1%, para a primeira, e de 65,6%, para a segunda), pelo que a troca do sal do tampão de NaCl para KI não se revelou vantajosa para aumentar a velocidade desta reacção.

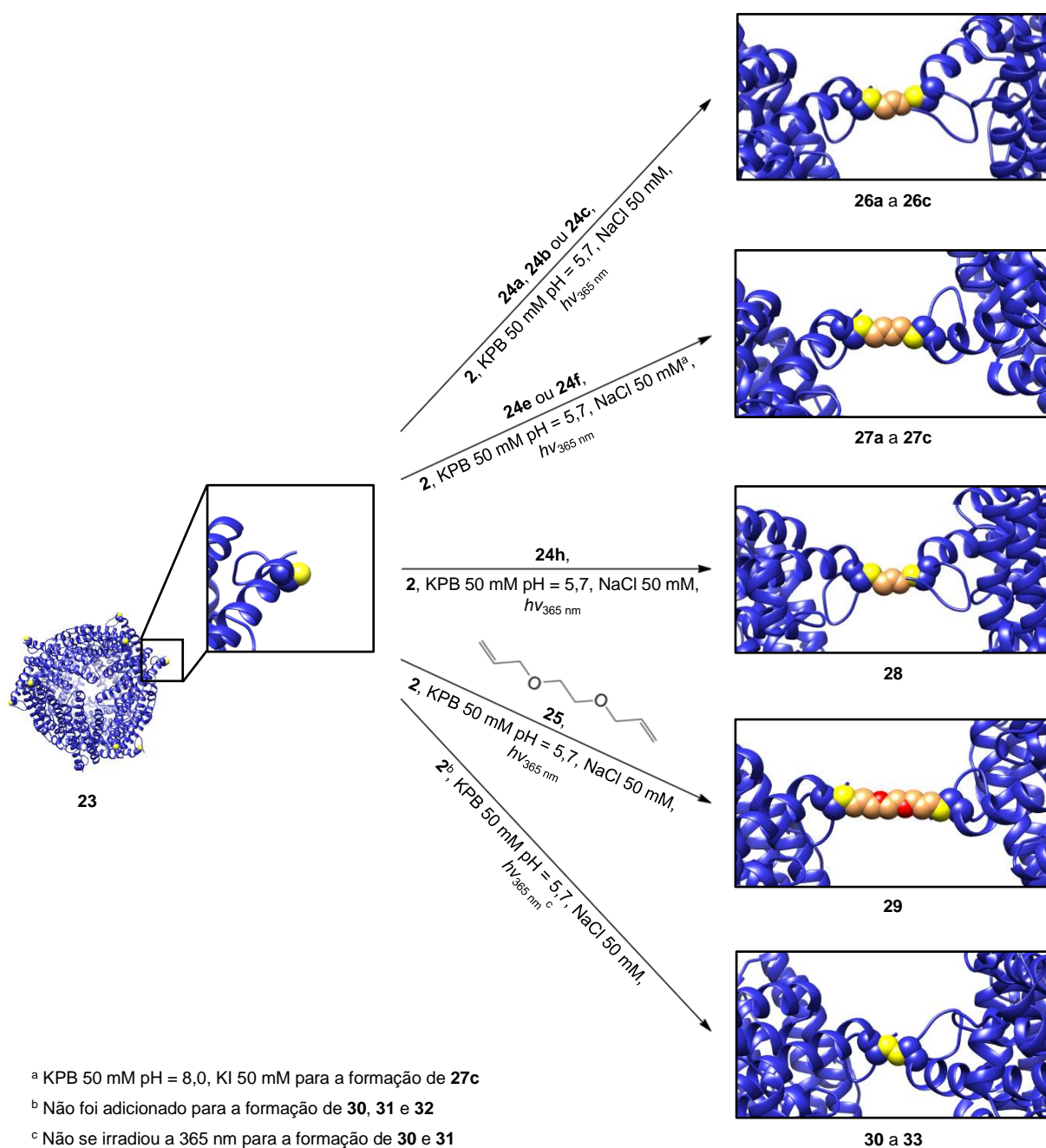
Para a determinação das concentrações dos bioconjugados **24**, assumiu-se o mesmo coeficiente de extinção molar que para **23** (os espectros de UV-Vis de cada bioconjugado são apresentados no Anexo VIII). As concentrações e volumes obtidos encontram-se indicadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Concentração final e volume obtidos dos bioconjugados de DpsT10C (**23**).

Bioconjugado de 23	24a	24b	24c	24d	24e	24f	24g	24h
c (μM)	11,7	12,0	11,1	6,76	13,1	352,2	421,2	303,1
V (μL)	3500	5000	4750	2750	3600	150	115	182

3.5. Preparação de estruturas proteicas supramoleculares artificiais de DpsT10C (**26a a 33**)

Após a modificação química da proteína **23** com diversas cadeias alquílicas, pretendeu-se conjugar as proteínas funcionalizadas com a proteína original, recorrendo-se aos acoplamentos tiol-eno e tiol-ino de modo a gerar estruturas proteicas supramoleculares artificiais. Para além disso, a proteína **23** foi também conjugada entre si utilizando o espaçador **25**, através do acoplamento tiol-eno, não sendo necessário modificá-la previamente. As várias reacções com os produtos previstos encontram-se representadas no Esquema 3.7, sendo o mecanismo radicalar o mesmo que o apresentado no Esquema 3.5.



Esquema 3.7 – Reacções de acoplamento de DpsT10C (**23**) com DpsT10C funcionalizada com 3-bromoprop-1-eno (**24a** a **24c**), com 4-bromobut-1-eno (**24e** e **24f**) ou com 3-bromoprop-1-ino (**24h**) e de acoplamento de **23** com 1,2-bis(aliloxi)etano (**25**). Para simplificação, as reacções são apresentadas apenas num dos resíduos de L-cisteína das 12 subunidades da molécula **23**. Os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína, os átomos de oxigénio de **25** e os átomos de carbono dos espaçadores estão destacados a amarelo, vermelho e cor-de-laranja claro, respectivamente. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados. Estrutura cristalográfica não publicada do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA.

A evolução temporal das reacções de acoplamento de **23** e **24** encontra-se apresentada na Figura 3.8, não interferindo o fotoiniciador **2** ou os radicais **34** e **35** no método de quantificação

dos grupos sulfidrilo (todos os valores envolvidos nas quantificações dos grupos estão indicados no Anexo VI.3).

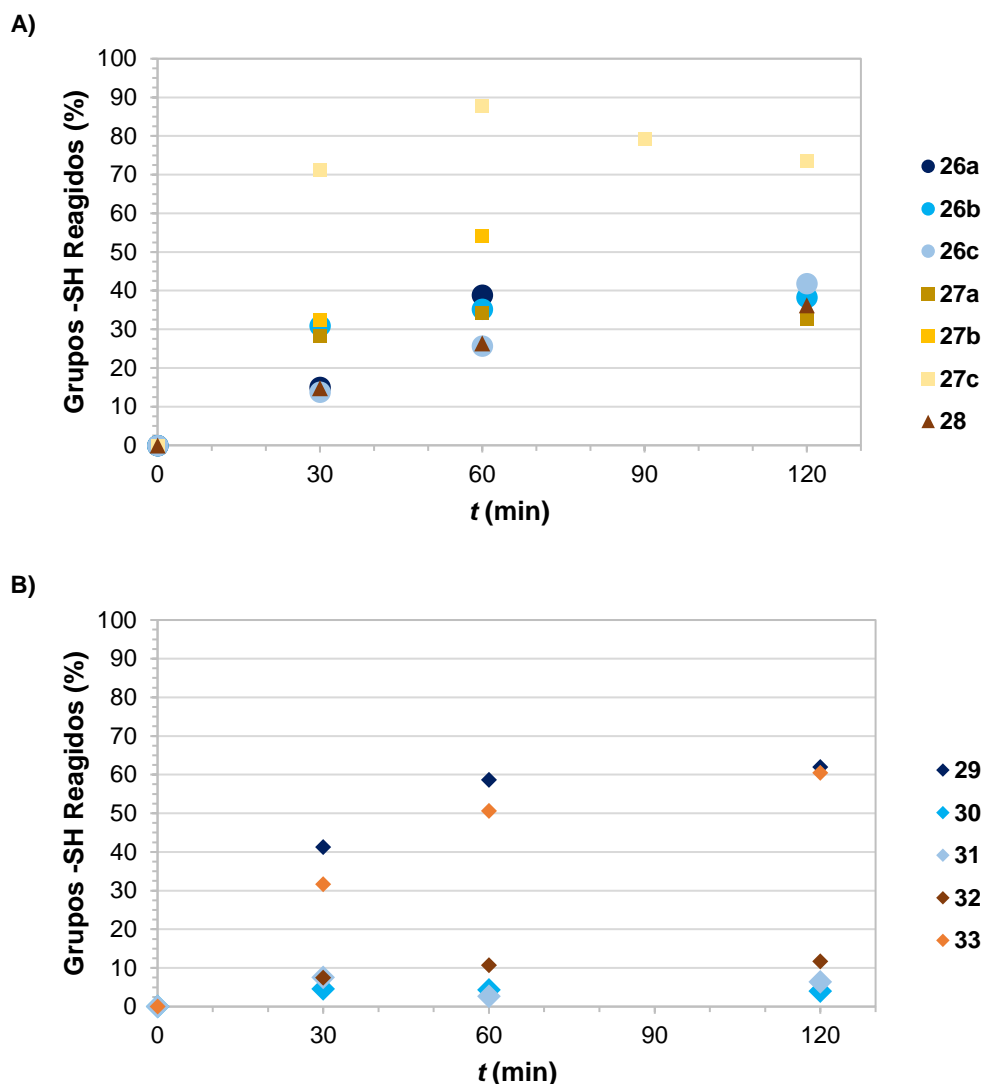


Figura 3.8 –Evolução temporal das reacções de acoplamento de DpsT10C (**23**) e de proteína DpsT10C funcionalizada (**24**) em diferentes condições experimentais.

A duplicação da concentração de fotoiniciador **2**, de 0,50 eq para 1,0 eq (em $t = 0$), na reacção de formação de **26b** (●), em relação à de **26a** (●), resultou num aumento da velocidade da reacção para o dobro, nos primeiros 30 min (desaparecimento de grupos sulfidrilo livres de 15,0% para **26a** e 30,9% para **26b**). Embora a reacção de síntese de **26b** tenha sido irradiada durante o dobro do tempo da reacção de **26a**, a partir dos 30 min parece ter-se atingindo o equilíbrio da reacção, como se pode observar pela formação de um patamar no gráfico da Figura 3.8 – A.

As reacções de formação de **26b** e **26c** (●) diferem no facto de o volume de **2** ter sido repartido em 3 fracções adicionadas ao longo do tempo, em vez de ter sido adicionado na sua totalidade no início da reacção. Este fraccionamento do volume de fotoiniciador levou a que a

reação progredisse mais lentamente do que quando adicionado na sua totalidade logo no início (para **26c**, obteve-se 13,8% de grupos reagidos, a $t = 30$ min, e 25,7%, a $t = 60$ min), observando-se um aumento quase linear de formação do produto **26c**.

O comportamento cinético das reações de acoplamento em que se utilizaram as proteínas funcionalizadas com **18b** é semelhante ao descrito para as sínteses de **26a** a **26c**. Na reação de síntese de **27a** (■), adicionou-se 0,50 eq de **2** no início da reação, enquanto para **27b** (■) usou-se 1,0 eq fraccionado em 12 adições sucessivas. No caso da síntese de **27c** (■), aumentou-se a quantidade de **2** para 1,7 eq fraccionados em 20 adições durante 3 h de exposição à radiação. Da análise da Figura 3.8 – A, pode observar-se que o aumento da quantidade de fotoiniciador e do seu fraccionamento possibilita uma maior progressão das reações, atingindo-se cerca de 34%, 54% e 88% de grupos reagidos, em 60 min, para **27a**, **27b**, e **27c**, respectivamente. Após 60 min de reação, a velocidade das reações tende a estabilizar. No caso da reação de formação de **27c**, a troca do sal do tampão de NaCl para KI aparenta tornar a reação mais eficiente.

Na última hora de exposição à radiação, nas reações de síntese de **27b** e **27c**, observou-se a formação de partículas insolúveis que interferiram tanto na quantificação dos grupos sulfidrilo livres (consultar as Tabelas VI.31 e VI.33 no Anexo III.3) como no espectro de UV-Vis (Figura 3.9)¹⁷⁹.

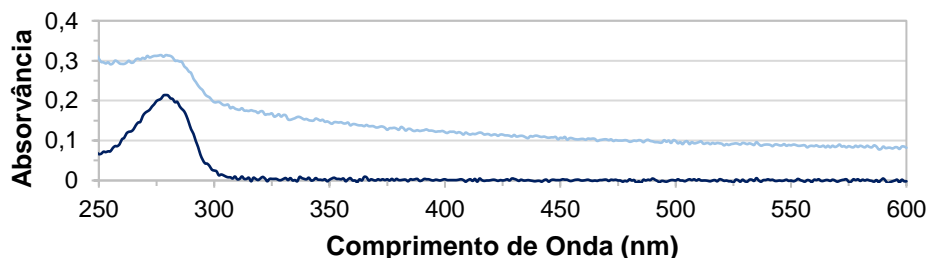


Figura 3.9 – Espectros de UV-Vis do meio reaccional de formação de **27b**, diluído 1:100, antes da adição de LAP (**2**) e da irradiação a 365 nm (linha a azul escuro) e após 120 min de reação (linha a azul claro).

O comprimento da cadeia dos reagentes alquilantes, **18a** (três átomos de carbono) e **18b** (quatro átomos de carbono), usados nas funcionalizações da proteína **23**, ou do espaçador **25** (oito átomos de carbono e dois de oxigénio) poderá também estar associada à maior reactividade observada em algumas reações de acoplamento. Desta forma, as reações de acoplamento entre a proteína **23** e os bioconjugados **24e** e **24f** (reagidos com **18b**) com síntese dos produtos **27a** a **27c** têm, aparentemente, um maior rendimento (i.e., maior percentagem de grupos sulfidrilo reagidos). Observa-se o mesmo na reação de síntese de **29** (◆), com percentagens de grupos sulfidrilo reagidos ao longo do tempo superiores às de **27b**.

Na reação **28** (▲), os valores das percentagens de grupos sulfidrilo reagidos comportam-se de modo semelhante aos de **26c**, o que está de acordo com as reações terem sido realizadas

em condições experimentais idênticas (utilizou-se proteína **23** funcionalizada com um reagente alquilante com três átomos de carbono e adicionou-se 1,0 eq de **2** em 12 fracções ao meio reaccional).

Para compreender a influência de cada componente das reacções de acoplamento, prepararam-se as seguintes reacções: i) na síntese de **30** (tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM + **23**) (♦) pretendeu-se avaliar o efeito da congelação e processamento na estabilidade da proteína **23**, assim como a oxidação dos grupos sulfidrilo ao longo do tempo reaccional; ii) com a formação de **31** (tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM + **23** + DMF) (♦), a interferência da presença de DMF na reacção; iii) com a síntese de **32** (tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM + **23** + $h\nu_{365\text{ nm}}$) (♦), o efeito da radiação a 365 nm; e iv) na reacção de formação de **33** (tampão KPB 50 mM pH = 5,7, NaCl 50 mM + **23** + $h\nu_{365\text{ nm}}$ + **2**) (♦), o efeito da radiação em conjunto com o fotoiniciador **2**. Nas reacções de formação de **30** e **31**, a percentagem de grupos sulfidrilo reagidos não ultrapassou os ~5%. Na síntese de **32**, o número de grupos sulfidrilo livres decresce em 11,7% ao longo do tempo. Este valor é superior ao dos casos anteriores por a radiação a 365 nm promover a formação de pontes dissulfureto intermoleculares, por clivagem homolítica da ligação S-H^{86,87} e posterior acoplamento de dois radicais tiis. Por fim, na formação de **33**, atinge-se 60,4% de grupos sulfidrilo reagidos. O facto de o valor obtido ser cerca de 5 vezes superior ao de **32** é justificado por **2** abstrair o átomo de hidrogénio de -SH e a formação de pontes dissulfureto ser assim favorecida.

3.6. Caracterização dos bioconjugados proteicos e dos produtos das reacções de acoplamento

3.6.1. Electroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das reacções de funcionalização e de acoplamento (após irradiação a 365 nm) foram analisados por SDS-PAGE, na presença e ausência de β -mercaptoetanol, e por PAGE para avaliar a formação de estruturas de massa molecular superior e composição dos mesmos. Os géis resultantes encontram-se apresentados nas Figuras 3.10 a 3.14.

Nos géis SDS-PAGE (Figura 3.10 – A, B e C) podem observar-se duas bandas de proteína maioritárias (assinaladas com rectângulos): uma, mais intensa, com massa molecular aparente de ~16 kDa, (rectângulos amarelos), e outra, menos intensa, com massa molecular aparente de ~30 kDa (rectângulos azuis escuros). A primeira é atribuída aos monómeros da proteína **23** e dos seus bioconjugados, enquanto a segunda é devida à presença de dímeros, sendo, no geral, mais intensa quando as amostras não foram incubadas com o agente redutor. A funcionalização da

proteína **23** com o reagente alquilante **18a**, bioconjugados **24a**, **24b** e **24c**, é comprovada pela diminuição da intensidade da banda do dímero (rectângulos azuis, poços 2 nos géis A e B, e poço 3, no gel C) quando comparada com a banda correspondente na proteína **23** sem β -mercaptoetanol (poço 1 dos géis A e B e poço 2 do gel C), uma vez que a ligação do grupo alilo aos grupos sulfidrilo impede a sua oxidação.

No gel PAGE (Figura 3.10 - D), a banda de **23** (poço 2) com maior mobilidade electroforética corresponde à proteína **23** predominantemente constituída por subunidades proteolizadas (que perderam os seis primeiros resíduos de aminoácidos MGKNFI – ver resultados de determinação da massa molecular por MALDI-TOF MS, secção 3.6.2). Esta proteólise levou tanto a uma redução da massa molecular de **23** de 215,9 kDa para, no mínimo, 207,6 kDa, como do ponto isoeléctrico (pI) teórico da sua subunidade de 5,01 para 4,90 (por perda de um resíduo de aminoácido de lisina), aumentando a sua mobilidade no gel. Por sua vez, a segunda banda com maior mobilidade electroforética no mesmo gel corresponde à proteína **23** constituída maioritariamente por subunidades que sofreram remoção da *N*-formilmetionina (ver secção 3.6.2), possuindo uma massa molecular de, no máximo, 214,3 kDa e a subunidade sem *N*-formilmetionina o mesmo pI teórico que **23** (5,01). Pode também observar-se que a funcionalização de **23** com o reagente alquilante **18a** não altera, significativamente, o perfil electroforético das proteínas (poços 3, 4 e 5).

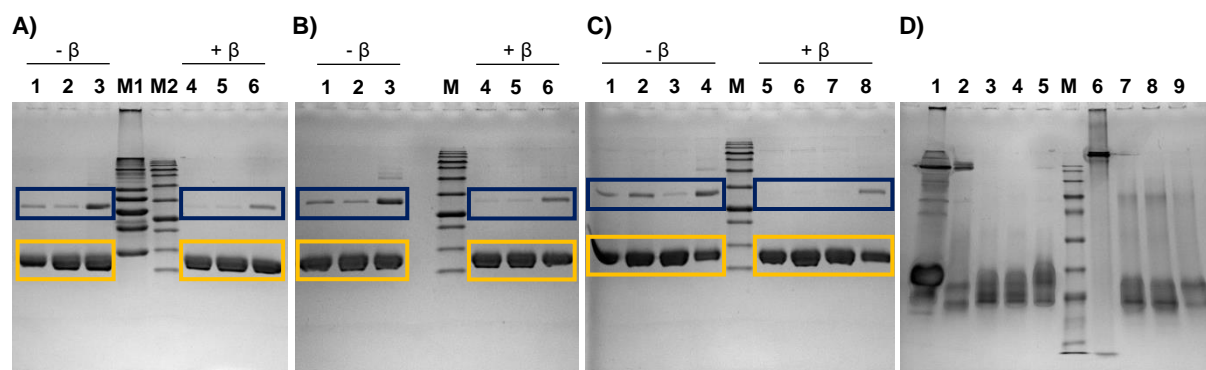


Figura 3.10 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com o reagente **18a** e do seu acoplamento com a proteína **23**. **A)**, **B)** e **C)** representam géis SDS-PAGE (poliacrilamida 15%), enquanto **D)** corresponde a um gel PAGE (poliacrilamida 12,5%); – β e + β indicam a constituição do tampão de amostras em β -mercaptoetanol. **A)** Proteína **23** (poços 1 e 4), o seu bioconjugado alquilado **24a** (poços 2 e 5) e o produto da reacção de acoplamento de ambas (**26a**) (poços 3 e 6). **B)** Proteína **23** (poços 1 e 4), proteína funcionalizada **24b** (poços 2 e 5) e o produto da sua reacção de acoplamento (**26b**) (poços 3 e 6). **C)** Proteína **23** (poços 2 e 6), proteína **24c** (poços 3 e 7) e o produto **26c** (poços 4 e 8); nos poços 1 e 5 foram aplicadas amostras da solução mãe de **23** (armazenada em tampão Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl ~242 mM, DTT 1 mM). **D)** Dps nativa (armazenada em tampão MOPS 200 mM pH = 7,0, NaCl 200 mM, poço 1), solução mãe de **23** (poço 2), proteínas **24a** (poço 3), **24b** (poço 4), **24c** (poço 5), ferritina de baço equino (oligómero de 24 subunidades) (poço 6), produtos **26a** (poço 7), **26b** (poço 8) e **26c** (poço 9). M1 e M2 correspondem, respectivamente, aos marcadores de massas moleculares LMW e NZYBlue (5 μ L). São destacadas as bandas de proteína correspondentes ao monómero da proteína (rectângulo amarelo) e ao dímero (rectângulo azul escuro).

Nos géis SDS-PAGE das duas proteínas funcionalizadas com **18b** (**24e** e **24f**, Figura 3.11 – A, C e E), pode observar-se que as proteínas se comportam de um modo semelhante às anteriores, com as diferenças de que as bandas com cerca de 30 kDa (rectângulos azuis, poços 1) têm praticamente a mesma intensidade que as da amostra de **23** (poços 2) e, após a redução das pontes dissulfureto formadas, cerca de metade das ligações responsáveis pelos dímeros não é afectada (poços 4). Estas ligações podem ser geradas pela adição do ião tiolato à ligação dupla do reagente bromado^{180,181}, uma vez que **18b** é menos reactivo do que **18a** e, conseqüentemente, o tempo de reacção aumentou em 4,5 vezes e 3,5 vezes, respectivamente para **24e** e **24f**. Nos géis PAGE (Figura 3.11 – B, D e F), as proteínas **24e** e **24f** (poços 1 dos géis B e D para **24e** e do gel F para **24f**) apresentam um comportamento semelhante à proteína **23** (poços 2), como seria esperado pelas amostras aplicadas nos géis SDS-PAGE com tampão de amostras sem agente redutor.

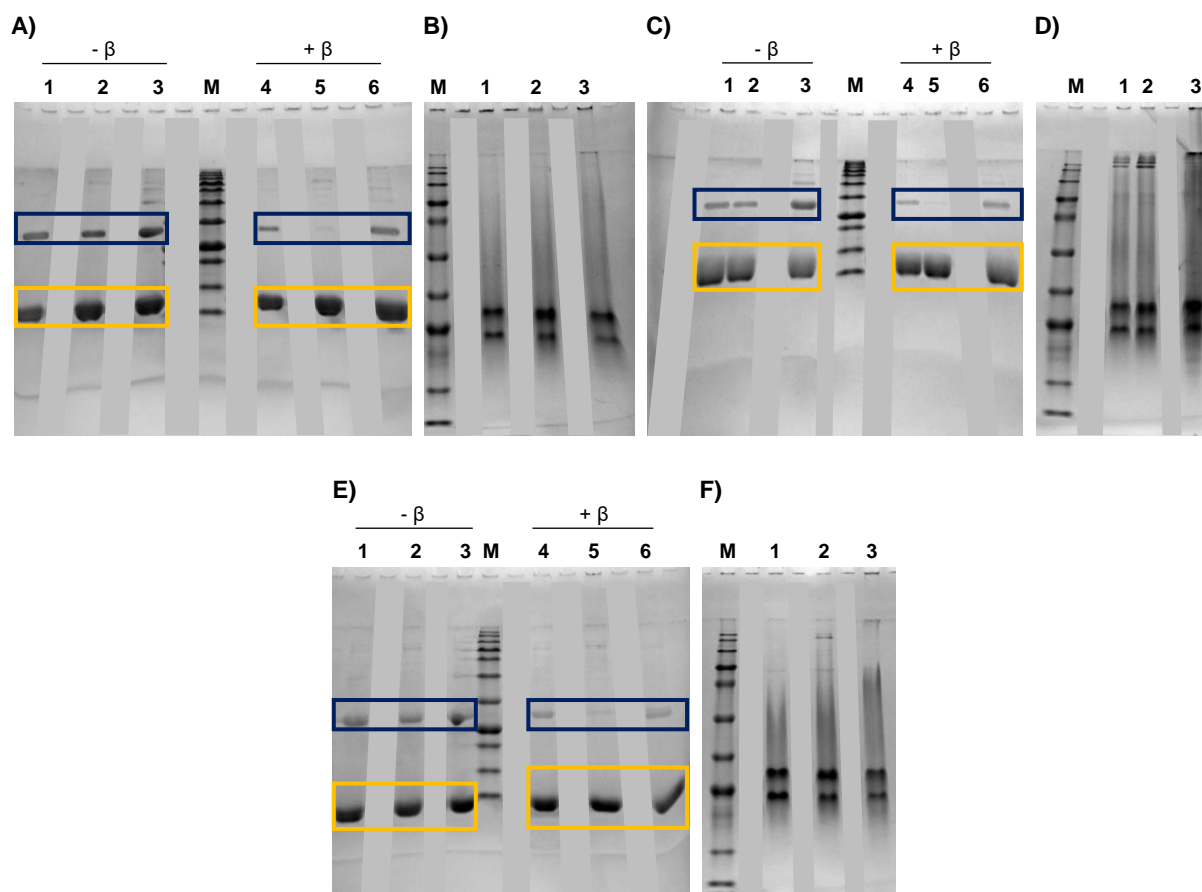


Figura 3.11 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com o reagente **18b** e do seu acoplamento com a proteína **23**. **A**), **C**) e **E**) representam géis SDS-PAGE (poliacrilamida 15% nos dois primeiros e 12,5% no último), enquanto **B**), **D**) e **F**) correspondem a géis PAGE (poliacrilamida 12,5%); – β e + β indicam a constituição do tampão de amostras em β -mercaptoetanol. **A**) e **C**) Bioconjugado alquilado **24e** (poços 1 e 4), proteína **23** (poços 2 e 5) e os produtos das reacções de acoplamento de ambos (**27a**, em **A**, e **27b**, em **C**) (poços 3 e 6). **B**) e **D**) Bioconjugado **24e** (poço 1), proteína **23** (poço 2) e os produtos **27a** (em **B**) e **27b** (em **D**) (poço 3). **E**) Proteína funcionalizada **24f** (poços 1 e 4), proteína **23** (poços 2 e 5) e o produto da sua reacção de acoplamento (**27c**) (poços 3 e 6). **F**) Proteína **24f** (poço 1), proteína **23** (poço 2) e o produto **27c** (poço 3). M corresponde ao marcador de massas moleculares NZYBlue (5 μ L). São destacadas as bandas de proteína correspondentes ao monómero da proteína (rectângulo amarelo) e ao dímero (rectângulo azul escuro).

Por fim, nos géis SDS-PAGE das duas proteínas funcionalizadas com **18c** (**24g** e **24h**, Figura 3.12 – A e B), embora a intensidade da banda com cerca de 30 kDa na amostra de **24h** em tampão sem β -mercaptoetanol (rectângulos azuis, poço 1 do gel B) seja menor do que a mesma banda correspondente na amostra de proteína **23** (poço 2 do gel B; o que indica que ocorreu funcionalização dos grupos sulfidrílo), na amostra de **24h** em tampão com β -mercaptoetanol (poço 4 do gel B) a banda mantém-se, diminuindo apenas a sua intensidade (assim como na amostra de **24g**, gel A). Também nestes casos os dímeros observados serão gerados por hidrotiolação da ligação tripla^{182–184}. Apesar de os grupos alcino poderem sofrer duas hidrotiolações sucessivas^{182–184}, devido ao tempo reaccional insuficiente, ao consumo dos grupos sulfidrílo pela reacção de propargilação e/ou a impedimentos estereoquímicos, ocorreu apenas a primeira hidrotiolação, como se pode ver pela ausência de bandas correspondentes a trímeros (54 kDa, rectângulos cor-de-laranja) nas amostras de **24g** e **24h** em tampão com β -mercaptoetanol. No gel PAGE (Figura 3.12 – C), quer na amostra de **24g** (poço 1), quer na de **24h** (poço 2), a quantidade de proteínas com menor mobilidade electroforética do que as proteínas dodecaméricas é menor do que na amostra de proteína **23** (poço 3), estando de acordo com o observado no gel SDS-PAGE.

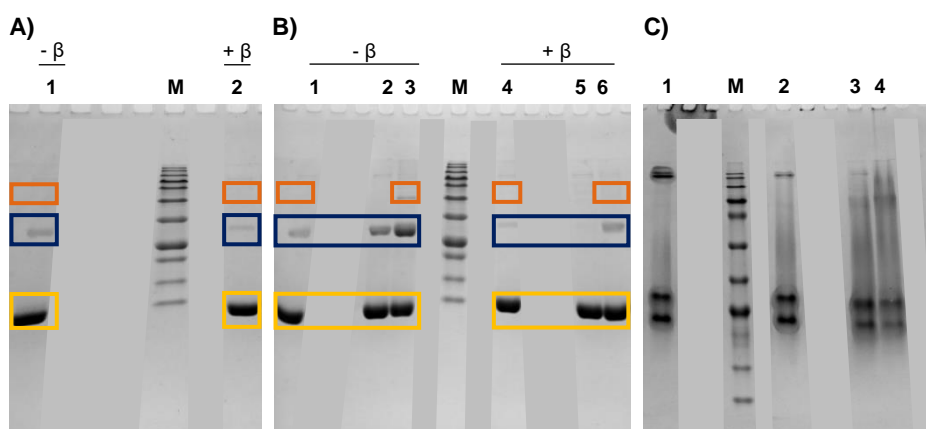


Figura 3.12 – Análise electroforética dos produtos das reacções de funcionalização com o reagente **18c** e do seu acoplamento com a proteína **23**. **A)** e **B)** representam géis SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%), enquanto **C)** corresponde a um gel PAGE (poliacrilamida 12,5%); – β e + β indicam a constituição do tampão de amostras em β -mercaptoetanol. **A)** Proteína funcionalizada **24g** (poços 1 e 2). **B)** Proteína **24h** (poços 1 e 4), proteína **23** (poços 2 e 5) e o produto da reacção de acoplamento de ambas (**28**) (poços 3 e 6). **C)** Proteínas **24g** (poço 1), **24h** (poço 2), **23** (poço 3) e o produto **28** (poço 4). M corresponde ao marcador de massas moleculares NZYBlue (5 μ L). São destacadas as bandas de proteína correspondentes ao monómero da proteína (rectângulo amarelo) e ao dímero (rectângulo azul escuro), assim como as zonas do gel onde se poderia observar a banda correspondente ao trímero (rectângulo cor-de-laranja).

Quanto aos produtos das reacções de acoplamento de **23** e **24**, nos géis SDS-PAGE (Figuras 3.10 – A a C, 3.11 – A, C e E, 3.12 – B e 3.13 – A) todas as bandas com cerca de 30 kDa, nas amostras com tampão com agente redutor, são mais intensas do que as mesmas bandas nas

amostras de **23** e **24** no mesmo tampão, o que corrobora a ocorrência dos acoplamentos tiol-eno e tiol-ino (também aqui se deu apenas uma adição do radical tiil, uma vez que não se observa nenhuma banda concordante com a formação de trímeros)^{71,92}. A mesma conclusão pode ser retirada da análise dos géis PAGE (Figuras 3.10 – D, 3.11 – B, D e F, 3.12 – C e 3.13 – B), pois a quantidade de proteínas na forma dodecamérica diminui comparativamente com as amostras de **23** e **24** e são originadas estruturas com menor mobilidade electroforética que se distribuem de forma contínua até ao topo do gel de resolução, na maior parte das amostras.

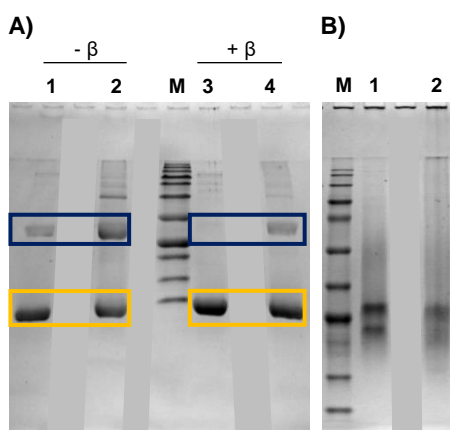


Figura 3.13 – Análise electroforética do produto da reacção de acoplamento utilizando o espaçador **25**. **A)** representa um gel SDS-PAGE, enquanto **E)** corresponde a um gel PAGE (ambos poliacrilamida 12,5%); – β e + β indicam a constituição do tampão de amostras em β -mercaptoetanol. **A)** Proteína **23** (poços 1 e 3) e o produto da reacção de acoplamento com **25** (**29**) (poços 2 e 4). **B)** Proteína **23** (poço 1) e o produto **29** (poço 2). M corresponde ao marcador de massas moleculares NZYBlue (5 μ L). São destacadas as bandas de proteína correspondentes ao monómero da proteína (rectângulo amarelo) e ao dímero (rectângulo azul escuro).

No caso dos produtos **30** a **33** (Tabela 2.7, secção 2.9), nos géis SDS-PAGE (Figura 3.14 – A e C) quase a totalidade dos dímeros formados desaparece na presença de agente redutor (os 60% de subunidades ligada covalentemente, em **30** e **31**, e 73%, em **32**, passam para 5-7% e 3%, respectivamente, após a adição de β -mercaptoetanol – Tabela 3.6), por redução de pontes dissulfureto. O mesmo já não se verifica em **33** (tanto em **33.S**, como em **33.P**, Figura 3.14 – C), pois apenas 3% das ligações formadas (em **33.S**) são reduzidas aquando da adição de β -mercaptoetanol. Estas ligações cruzadas não redutíveis podem ser originadas pela adição intercadeia do radical tiil a aminoácidos fenilalanina^{185,186}, como Fen-5, ou tirosina^{186,187}, como Tir-82, Tir-85, Tir-151 ou Tir-154 (Figura 3.15), originando, por exemplo, um radical ciclo-hexadienil alquiltio-substituído e formando uma ligação tioéster.

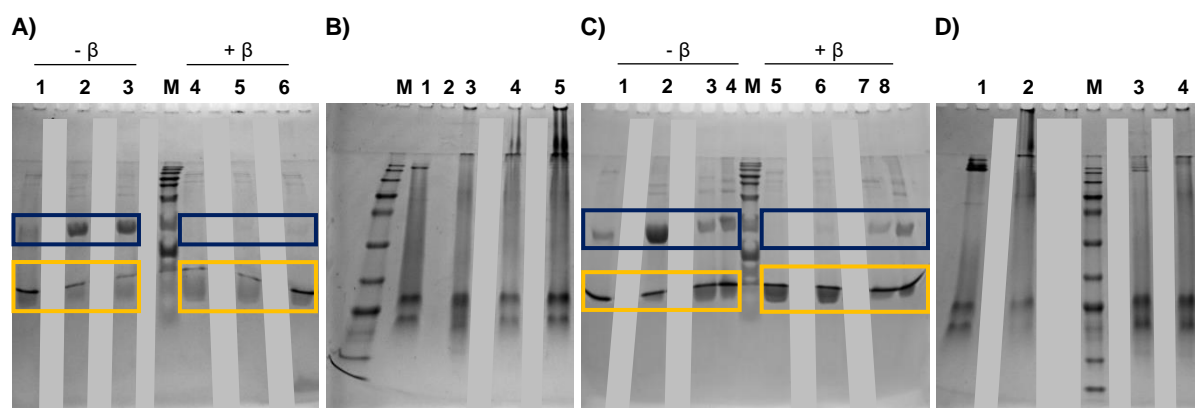


Figura 3.14 – Análise electroforética dos produtos das reacções de acoplamento de proteínas sem espaçador (**30** a **33**). **A)** e **B)** representam géis SDS-PAGE, enquanto **C)** e **D)** correspondem a géis PAGE (todos poliacrilamida 12,5%); - β e + β indicam a constituição do tampão de amostras em β -mercaptoetanol. **A)** Solução mãe de **23** (armazenada em tampão Tris-HCl 10 mM pH = 7,6, NaCl ~242 mM, DTT 1 mM; poços 1 e 4) e produtos **30** (poços 2 e 5) e **31** (poços 3 e 6). **B)** Solução mãe de **23** (poço 1), proteínas **29.S** (poço 2), **29.P** (poço 3) e produtos **30** (poço 4) e **31** (poço 5). **C)** Solução mãe de **23** (poços 1 e 5), produto **32** (poços 2 e 6) e proteínas **33.S** (poços 3 e 7) e **33.P** (poços 4 e 8). **D)** Solução mãe de **23** (poço 1), produto **32** (poço 2), fracção **33.S** (poço 3) e fracção **33.P** (poço 4). Não foi possível normalizar a quantidade de proteína dodecamérica das amostras de **29.S** para 20 pmol. M corresponde ao marcador de massas moleculares NZYBlue (5 μ L). São destacadas as bandas de proteína correspondentes ao monómero da proteína (rectângulo amarelo) e ao dímero (rectângulo azul escuro).

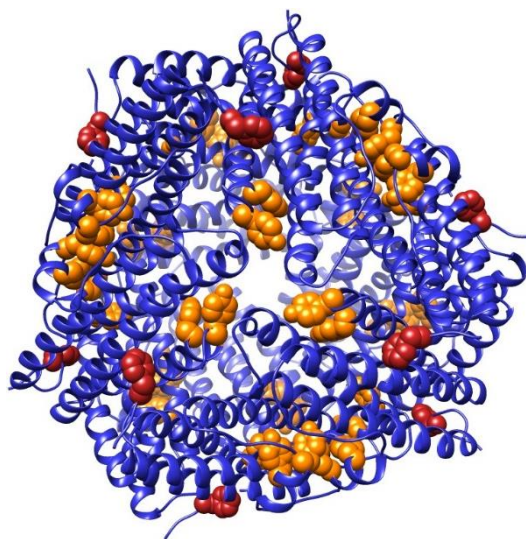


Figura 3.15 – Estrutura de DpsT10C (**23**) com os resíduos de fenilalanina-5, das várias cadeias, assinalados a vermelho e com os resíduos de tirosina-82, -85, -151 e -154 identificados a cor-de-laranja (estrutura cristalográfica não publicada do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA).

Nas reacções de funcionalização de **23** em que foi possível, estimou-se a percentagem de reacções secundárias ocorridas como sendo a percentagem de subunidades ligadas covalentemente, quer por pontes dissulfureto, quer por outro tipo de ligação, a partir das imagens digitais dos géis SDS-PAGE. Os valores obtidos encontram-se apresentados na Tabela 3.5 (as estimativas das percentagens de proteína em cada banda, para os vários produtos de reacção, assim como as equações empregues nos cálculos realizados, são apresentadas no Anexo V).

Tabela 3.5 – Estimativa da percentagem de subunidades das proteínas ligadas covalentemente, nos produtos das reacções de funcionalização de DpsT10C (**23**) **24a** a **24c** e **24e** a **24h**.^a

Bioconjugado de 23	Reagente alquilante	Subunidades ligadas (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
24a (Figura 3.10 – A)	18a	4	3	0
24b (Figura 3.10 – B)		6	4	0
24c (Figura 3.10 – C)		2	2	0
24e (Figura 3.11 – A)	18b	26	13	12
24e (Figura 3.11 – C)		14	6	7
24f (Figura 3.11 – E)		19	10	8
24g (Figura 3.12 – A)	18c	6	3	3
24h (Figura 3.12 – B)		8	5	3

^a As estimativas das percentagens de proteína em cada banda possuem um erro associado de 6,7%.

Relativamente às estimativas das percentagens de subunidades ligadas covalentemente, os produtos das reacções de funcionalização com **18a** (**24a**, **24b** e **24c**) apresentam valores, dentro do erro do método, semelhantes aos dos produtos das reacções com **18c** (**24g** e **24h**), com valores entre 2% e 8%, enquanto no caso de **18b** (**24e** e **24f**), os valores são mais elevados, 14-26%. Desta forma, observa-se que a percentagem de reacções secundárias ocorridas aumenta com a diminuição da reactividade do reagente bromado.

O rendimento das reacções de acoplamento foi determinado estimando-se a percentagem de subunidades ligadas covalentemente, que não por pontes dissulfureto, produzidas no decorrer das reacções. Os valores determinados encontram-se indicados na Tabela 3.6 (as estimativas das percentagens de proteína em cada banda são também apresentadas no Anexo V).

Tabela 3.6 – Estimativa da percentagem de subunidades das proteínas ligadas covalentemente, nos produtos das reacções de acoplamento das proteínas DpsT10C (**23**) e funcionalizadas **24**.^a

Produto	Subunidades ligadas (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
26a (Figura 3.10 – A)	19	8	9
26b (Figura 3.10 – B)	25	9	14
26c (Figura 3.10 – C)	24	10	13
27a (Figura 3.11 – A)	28	13	9
27b (Figura 3.11 – C)	29	18	7

Produto	Subunidades ligadas (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
27c (Figura 3.11 – E)	29	17	6
28 (Figura 3.12 – B)	34	23	10
29 (Figura 3.13 – A)	42	23	18
30 (Figura 3.14 – A)	60	54	5
31 (Figura 3.14 – A)	60	53	7
32 (Figura 3.14 – C)	73	70	3
33.S (Figura 3.14 – C)	22	3	19
33.P (Figura 3.14 – C)	30	0	32

^a As estimativas das percentagens de proteína em cada banda possuem um erro associado de 6,7%.

Nas reacções de formação de **26a** a **26c**, o aumento da quantidade total de fotoiniciador, a adição fraccionada deste e a duplicação do tempo reaccional não parece favorecer a ligação covalente de subunidades, tendo em conta o erro do método (19-25% de subunidades ligadas e 9-14% de subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto). Verifica-se o mesmo para as reacções de formação de **27a** a **27c**, onde também a troca do sal do tampão reaccional (de NaCl para KI) não parece influenciar a estimativa da percentagem de subunidades ligadas, nem de subunidades ligadas covalentemente que não por pontes dissulfureto (tendo-se atingido ~30% para a primeira e 6-9% para a segunda).

Comparando as estimativas das percentagens de subunidades ligadas covalentemente calculadas com as percentagens finais de grupos sulfidrílo reagidos obtidas (Tabela 3.6 e Figura 3.8, respectivamente), pode-se observar que os valores para **26a** a **27c**, **29** e **33** nas primeiras são menores do que nas segundas. Isto pode dever-se à ocorrência de uma reacção intramolecular do radical tiil originado com o resíduo de aminoácido Fen-6^{185,186}. Em **33.P** a estimativa da percentagem de subunidades ligadas é superior à estimativa em **33.S**, uma vez que a formação de estruturas proteicas de massa molecular superior, capazes de serem recolhidas por centrifugação, implica a formação de mais ligações cruzadas entre proteínas dodecaméricas. Para **30** a **32** observa-se o oposto, pelo que o aumento das estimativas das percentagens de subunidades ligadas relativamente às percentagens dos grupos sulfidrílo reagidos terá sido originado por posterior formação de pontes dissulfureto (uma vez que nenhum agente redutor se encontrava presente em solução). Para **28**, as duas percentagens são semelhantes (~35%).

A estimativa da percentagem de subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto, em **33** (correspondente à obtida se o produto do controlo **33** não tivesse sido fraccionado em **33.S** e **33.P**), seria de cerca de 30%, superior em mais de 10% a qualquer uma das restantes reacções. O

aparecimento destas ligações cruzadas originadas apenas na presença de **23**, **2** e exposição à radiação a 365 nm não invalida que as ligações cruzadas das restantes reacções sejam formadas através do acoplamento tiol-eno (ou tiol-ino, no caso de **28**), apenas indica que, pelo menos, uma reacção de acoplamento secundária (que não a formação de ligações S-S) está também envolvida na criação de estruturas proteicas supramoleculares artificiais. Se esta reacção secundária e a oxidação dos grupos -SH fossem os únicos responsáveis pela formação de ligações cruzadas, a reacção **29** deveria ter um resultado idêntico, independentemente de o espaçador **25** se encontrar também em solução, quando tal não acontece (o produto da reacção **29** possui 18% das subunidades ligadas por pontes que não dissulfureto e 23% de subunidade ligadas por pontes dissulfureto, enquanto o produto de **33** apresenta 30% das subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto e não possui subunidades ligadas por pontes dissulfureto). A quase inexistência de pontes dissulfureto no produto do controlo **33** deve-se ao facto de o gel ter corrido de forma anómala, influenciando a quantificação das suas bandas.

Quanto aos produtos **30** a **32**, a estimativa da percentagem de subunidades ligadas covalentemente que não por pontes dissulfureto deve-se, provavelmente, a pontes dissulfureto residuais que não chegaram a ser reduzidas pelo β -mercaptoetanol.

Ao analisar-se as estimativas das percentagens de subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto dos produtos das reacções **26c** (13%), **27b** (7%), **28** (10%) e **29** (18%), observa-se que a diferença de valores dos três primeiros se encontra dentro do erro do método, o que indica que o aumento do comprimento do espaçador em um átomo de carbono (**26c** e **28** possuem espaçadores com 3 átomos de carbono, enquanto o de **27b** possui 4 átomos) não é suficiente para promover uma formação superior de ligações cruzadas, devido aos impedimentos estereoquímicos. No caso de **29**, estes são minimizados por o espaçador possuir mais sete átomos (dois de oxigénio e cinco de carbono) do que os de **26c** e **28**, permitindo que mais ligações ocorram.

3.6.2. MALDI-TOF MS

De forma a confirmar a derivatização dos resíduos de L-cisteína de **23** com **18a** e a estudar a reacção de irradiação de **23** com o produto da reacção anterior, analisou-se **23**, **24c** e **26c** por MALDI-TOF MS (Figura 3.16).

No espectro de MALDI-TOF MS de **23** (Figura 3.16 – A), é possível observar um ião monocarregado positivamente de 17851,5 m/z , correspondente às subunidades de **23** que sofreram remoção da *N*-formilmetionina (17858,14 Da), provavelmente durante o processo de síntese proteica¹⁸⁸. Por sua vez, o ião monocarregado positivamente de 17290,4 m/z é gerado pela proteólise dos seis primeiros resíduos de aminoácidos MGKNFI da extremidade N-terminal da subunidade de **23** (17298,48 Da). Os iões com razão m/z entre 8500 m/z e 9000 m/z correspondem aos iões das subunidades de **23** referidos duplamente carregados.

A modificação química dos resíduos de L-cisteína das subunidades de **23** com **18a** introduziria o grupo $-CH_2CHCH_2$, o que levaria ao aumento da massa molecular de ambos os tipos de subunidades em 41,08 Da. Este incremento pode ser observado em todos os iões monocarregados do espectro de **24c** (Figura 3.16 – B), passando estes a apresentar os valores de 17329,1 m/z (subunidades proteolisadas) e 17892,2 m/z (subunidades sem *N*-formilmetionina).

Por fim, no espectro do produto **26c** (Figura 3.16 – C) estão presentes os mesmos iões que no espectro de **24c**. Os iões do espectro de **23** não são observáveis no de **26c** provavelmente por serem consumidos também na formação de pontes dissulfureto e por o espectro não possuir resolução suficiente para tal, encontrando-se sobrepostos com os iões das subunidades funcionalizadas. Uma vez que não se encontram nenhum dos possíveis iões gerados pela ligação de uma das fracções de **2** com qualquer uma das subunidades existentes em solução (subunidades acopladas com **34**: 17444,68 Da e 18004,34 Da; subunidades acopladas com **35**: 17437,55 Da e 17997,21 Da), não há indicação de que estas sejam reacções que compitam com os acoplamentos tiol-eno e tiol-ino pretendidos. No entanto, ocorrendo ligação de fracções de **2** com subunidades de **23**, em quantidades reduzidas, o espectro pode não possuir resolução suficiente para diferenciar estes iões daqueles com maior intensidade.

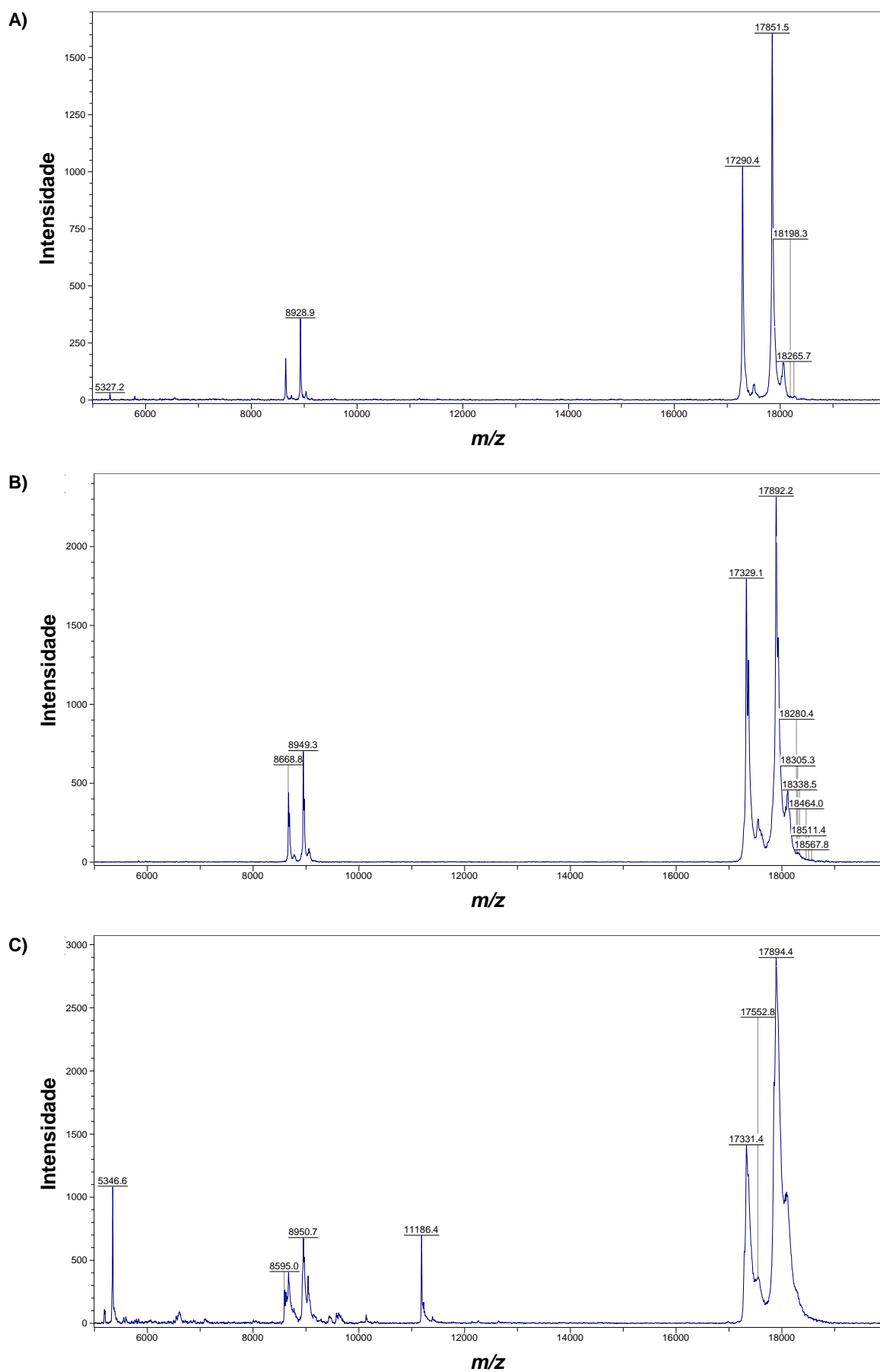


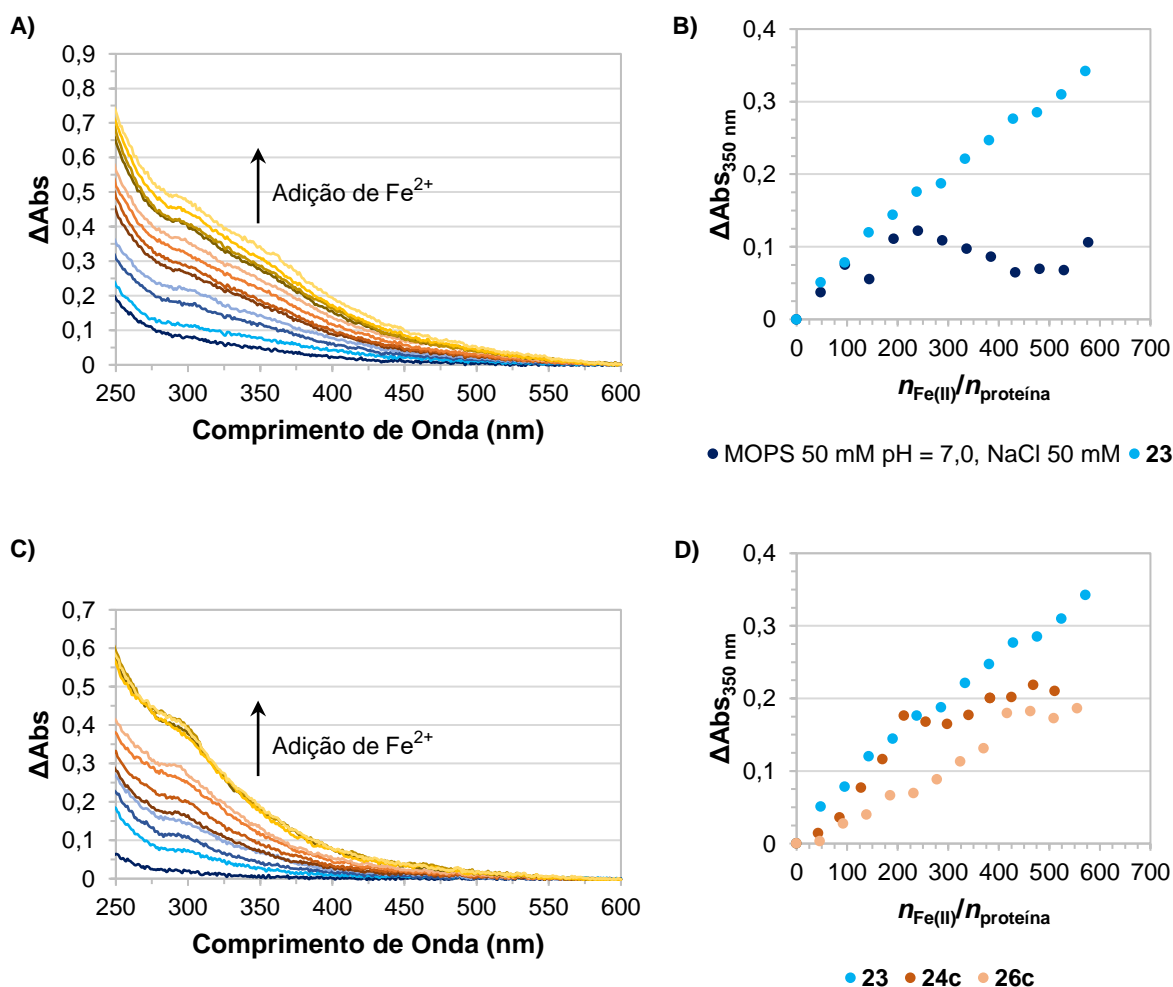
Figura 3.16 – Espectros de MALDI-TOF MS, entre 5000 m/z e 20 000 m/z , de: **A)** proteína DpsT10C (**23**), **B)** proteína funcionalizada **24c** e **C)** produto da reação de acoplamento de ambas (**26c**).

3.6.3. Actividade de ferroxidação

Com o objectivo de avaliar a actividade enzimática (de oxidação rápida de iões ferrosos) das proteínas funcionalizadas e dos produtos das reacções de acoplamento com a da proteína original **23**, estes foram reagidos com ferro ferroso na presença de H_2O_2 , em MOPS 50 mM pH = 7,0, NaCl 50 mM. Optou-se por escolher os produtos **26c**, **28** e **29** das reacções de acoplamento por estes terem sido preparados com espaçadores com estruturas diferentes. Por sua vez, seleccionaram-se as proteínas funcionalizadas **24c** e **24h** por terem sido as utilizadas nas reacções de acoplamento referidas.

Os espectros-diferença, obtidos pela diferença entre o espectro adquirido após cada adição e o espectro da proteína sem ferro e sem H_2O_2 (antes da primeira adição), são apresentados na Figura 3.17 – A, C, E e G.

De modo a avaliar a capacidade de oxidação/incorporação de ferro pelas várias proteínas, representou-se a variação da absorvância a 350 nm ($\Delta\text{Abs}_{350\text{ nm}}$) em função da razão molar iões Fe^{2+} /proteínas dodecaméricas em solução, $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$ (Figura 3.17 – B, D, F e H).



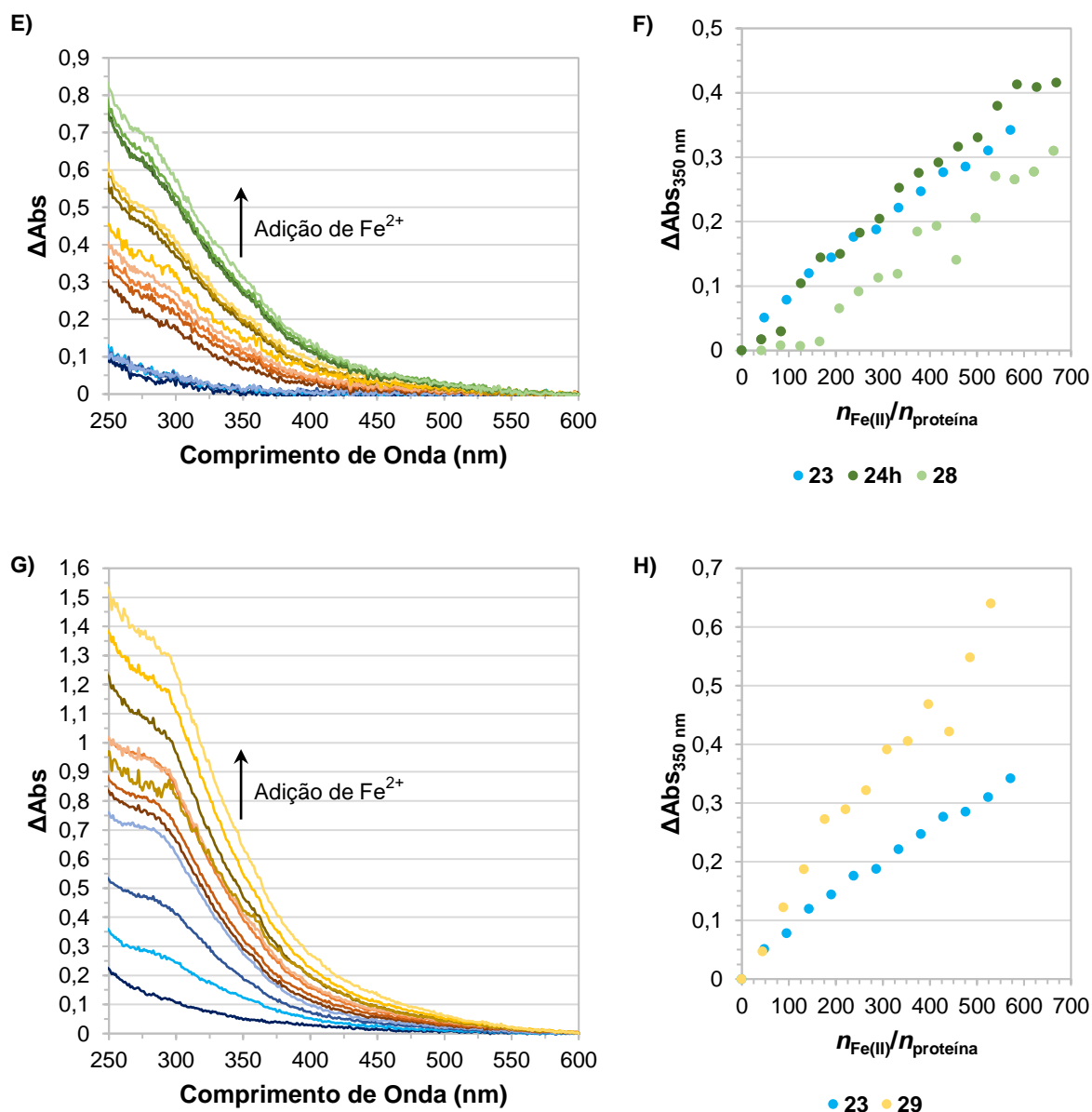


Figura 3.17 – Reacção de oxidação de Fe²⁺, em tampão MOPS 50 mM pH = 7,0, NaCl 50 mM, na presença de um excesso de H₂O₂, em condições aeróbias, de DpsT10C (23) (A), das proteínas funcionalizada 24c e 24h e dos produtos 26c, 28 e 29 das reacções de acoplamento (C, E e G, respectivamente). À direita, encontram-se representadas as curvas de variação $\Delta\text{Abs}_{350\text{ nm}}$ em função da razão $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$, para o controlo sem proteína (B), para cada proteína funcionalizada e para os produtos das suas reacções de acoplamento em comparação com a proteína 23 (D, F e H). Cada ponto representa uma adição de ~48 eq de Fe²⁺.

Uma vez que, em todos os ensaios (Figura 3.17), os valores da absorvância entre 310 nm e 420 nm, característico de espécies de ferro férrico ligado a átomos de oxigénio, aumentam com o aumento da razão $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$ e que não se verifica precipitação das espécies de óxido férrico, todas as proteínas funcionalizadas e todos os produtos das reacções de acoplamento analisados mantêm a capacidade catalítica de oxidação/incorporação de ferro [reacção de ferroxidação e mineralização, respectivamente]^{155,176}. Os valores de rácios $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$

atingidos são também indicativos da conservação da estrutura quaternária das proteínas, mantendo a sua cavidade interna onde o mineral de ferro é armazenado.

Ao compararem-se os perfis das curvas da variação de $\Delta\text{Abs}_{350\text{ nm}}$, em função da razão $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$, da proteína **23** com a do tampão MOPS 50 mM pH = 7,0, NaCl 50 mM (Figura 3.17 – B), pode-se verificar que acima da razão ~ 200 se começa a observar precipitação dos óxidos de ferro férrico no ensaio sem proteína (diminuição da $\Delta\text{Abs}_{350\text{ nm}}$), enquanto no caso da proteína **23**, os valores de absorvância aumentam até à última adição ($n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}} \approx 600$), demonstrando que, ao contrário do tampão, **23** coordena os iões ferrosos adicionados e incorpora as espécies de ferro férrico geradas no seu interior, mantendo-as em solução e evitando que precipitem^{155,189,190}.

No caso das adições de ferro e H_2O_2 à proteína funcionalizada **24c** e **26c** (Figura 3.17 – C e D), atinge-se a saturação para valores $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}} \approx 375$, enquanto no caso da proteína **23** não se observa um patamar nas condições experimentais usadas. Nestes casos, as alterações introduzidas parecem afectar negativamente a função catalítica da enzima.

O comportamento catalítico da proteína funcionalizada **24h** (Figura 3.17 – F) é idêntico ao da proteína **23**, pelo que a adição de prop-1-ino não parece ter alterado a capacidade catalítica da proteína. No caso do produto de acoplamento **28** (Figura 3.17 – E e F), os valores de ΔAbs não seguem um aumento linear inicial como nas restantes amostras, sendo melhor descritos por uma curva sigmoideal (os valores mantêm-se constantes até a adição de 165,8 eq de iões). Esta observação parece indicar que, numa fase inicial, a proteína liga ferro mas não o oxida, podendo dever-se à ligação de iões ferrosos em sítios não catalíticos na estrutura proteica. Após esta fase inicial, a proteína **28** tem um comportamento semelhante ao de **23**.

Finalmente, o perfil da curva ΔAbs em função da razão $n_{\text{Fe(II)}}/n_{\text{proteína}}$ para o produto da reacção de irradiação **29** (Figura 3.17 – G e H) é diferente dos restantes, podendo atribuir-se a uma maior eficiência catalítica desta estrutura proteica artificial (velocidades de oxidação e/ou mineralização mais elevadas) ou pela formação de espécies férricas distintas (com coeficientes de absortividade molar distintos).

3.6.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

De modo a analisar-se a estrutura secundária do produto de acoplamento **29** e a estabilidade da estrutura proteica (que poderá ser afectada pelas condições experimentais usadas quer na preparação da proteína **23** quer na reacção de acoplamento na presença do fotoiniciador) traçaram-se os espectros de CD de **29.P**, **30**, **31** e **33.P** e de SRCD de Dps, **29.P** e **33.P** (Figura 3.18).

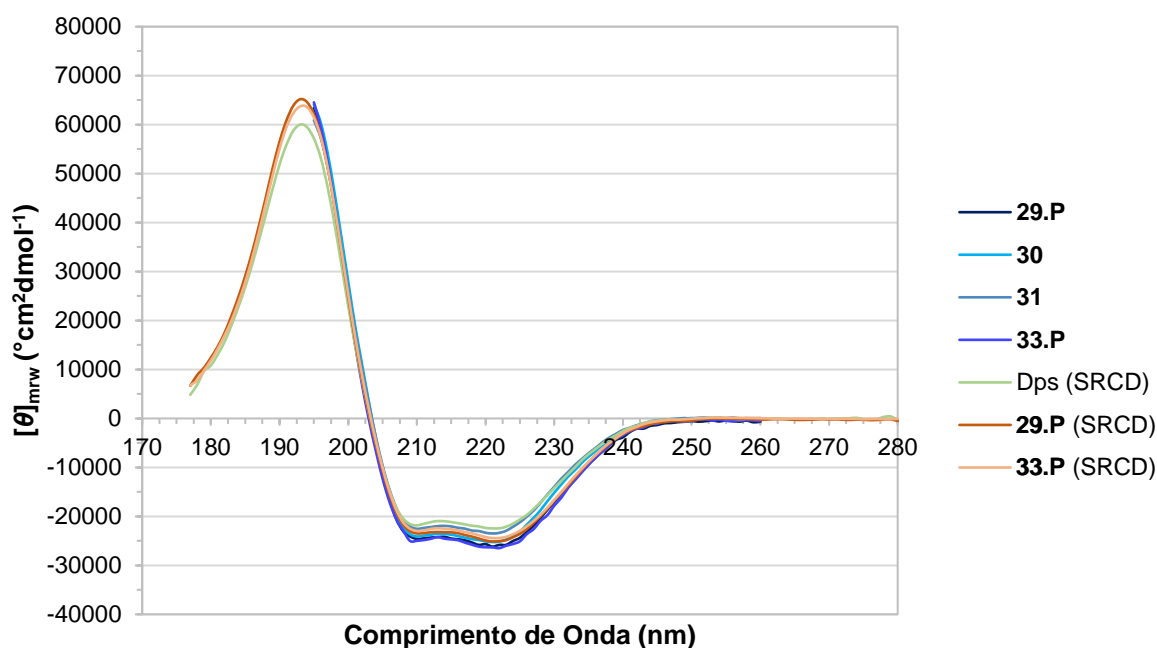


Figura 3.18 – Espectros de CD (entre 195 nm e 260 nm, a 20 °C) e de SRCD (entre 177 nm e 280 nm, a 25 °C) da proteína Dps, dos péletes dos produtos **29** e **33** (**29.P** e **33.P**, respectivamente) e dos produtos **30** e **31**.

Posteriormente, a partir dos espectros de SRCD de Dps, **29.P** e **33.P**, estimou-se a percentagem dos elementos de estrutura secundária que as constituem (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Estimativa da composição em elementos de estrutura secundária da proteína Dps e dos péletes dos produtos de acoplamento **29** (**29.P**) e **33** (**33.P**).

Proteína	Tipos de estrutura secundária (%)					
	Hélice α regular	Hélice α distorcida	Cadeia β regular	Cadeia β distorcida	Voltas	Não ordenada
Dps	48	20	7	2	8	15
29.P	57	23	2	0	8	9
33.P	58	22	3	0	7	8

Ao analisar-se as estimativas das percentagens em elementos de estrutura secundária de **29.P** e **33.P**, verifica-se que diferem apenas 1% entre si, nos vários elementos de estruturas. Por sua vez, a proteína Dps apresenta um valor em hélices α inferior em 12% ao das proteínas anteriores e ~7% mais cadeias β e estrutura não ordenada. Esta diminuição do conteúdo de hélices α observada para a proteína Dps deve-se ao facto de a proteína ser susceptível ao feixe de radiação usado na aquisição de espectros de SRCD.

As estimativas da composição da estrutura secundária em hélices α e cadeias β (regulares e distorcidas para ambas), para as proteínas **29.P** e **33.P**, mostram valores 1-2% superiores aos calculados a partir da estrutura cristalográfica de Dps (respectivamente, 78% e 3%). Por sua vez, a soma das estimativas do conteúdo em elementos de estrutura secundária em voltas e em estrutura não ordenada foi 3-5% inferior (obteve-se 20% com a ferramenta Stride, que apenas determina os resíduos com voltas, não com estrutura não ordenada).

Uma vez que a proteína **23** é um mutante da proteína Dps, no qual o resíduo de treonina 10 foi substituído por um resíduo de cisteína, as suas estruturas secundárias deveriam ser idênticas. Não variando os resultados obtidos pelos dois métodos mais de 5% e não sendo esta diferença significativa, as estimativas da composição das estruturas secundárias de **29.P** e **33.P**, a partir dos espectros de SRCD, estão de acordo com a estrutura cristalográfica da proteína nativa. Desta forma, pode-se concluir que o procedimento experimental usado nas sínteses dos produtos **29** e **33** e as ligações cruzadas estabelecidas não causam alteração da estrutura secundária da proteína de partida **23**.

Com o objectivo de avaliar a estabilidade da estrutura supramolecular do produto **29** (e compará-la com a de **30**), determinou-se os valores de temperatura de fusão (T_m , descrita como o ponto médio de desnaturação térmica), por espectroscopia de CD, adquirindo-se espectros numa gama de temperatura entre 20 °C e 90 °C (Figura 3.19 – A, C e E). Realizou-se também uma rampa de temperatura inversa, arrefecendo-se de 90 °C a 20 °C, de modo a averiguar a reversibilidade da desnaturação das proteínas (Figura 3.19 – B, D e F).

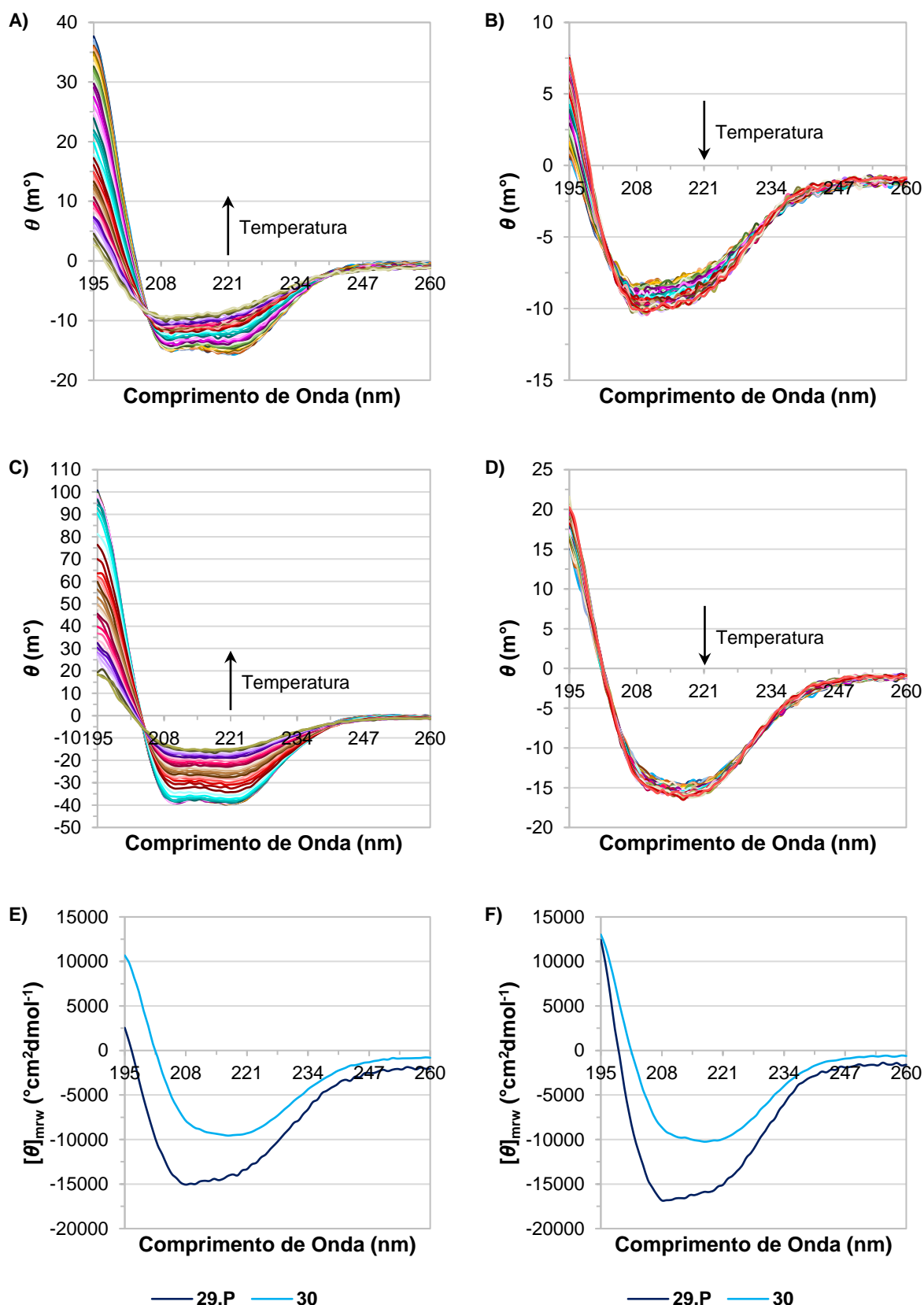


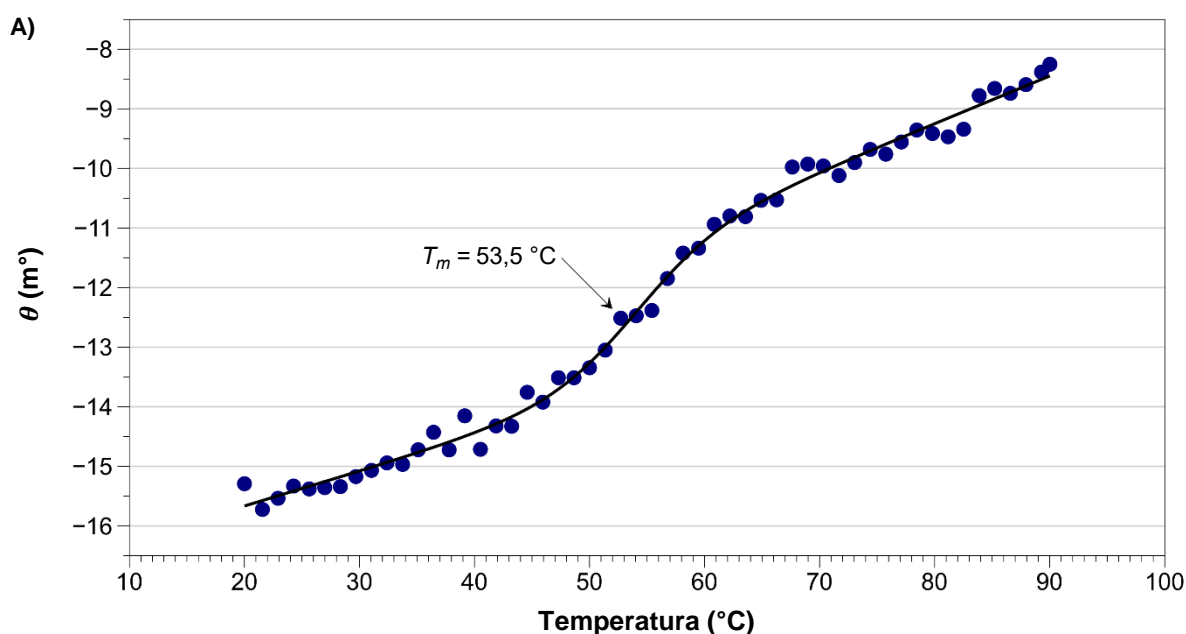
Figura 3.19 – Análise da estabilidade térmica do produto 29 (pélete do produto de acoplamento 29, 29.P) e do produto 30, por espectroscopia de CD, entre 195 nm e 260 nm. **A) e C)** Rampas de temperatura, entre 20 °C e 90 °C, de 29.P e 30, respectivamente. **B) e D)** Rampas de temperatura inversa, entre 90 °C e 20 °C, de 29.P e 30, pela ordem indicada. **E) e F)** Espectros de CD à temperatura final das rampas de temperatura e de temperatura inversa, respectivamente.

Sujeitando-se as proteínas **29.P** e **30** a uma rampa de temperatura entre 20 °C e 90 °C, verifica-se que os espectros de CD deixam de apresentar o perfil característico associado a hélices α , para se assemelharem mais a espectros de folhas β antiparalelas^{156,157,191,192}. No entanto, no final da rampa de temperatura inversa (de 90 °C a 20 °C), os espectros de CD das várias amostras praticamente não sofrem alteração (Figura 3.19 – E e F), pelo que as proteínas não possuem a capacidade de renaturar a estrutura secundária perdida.

Os valores de T_m foram posteriormente determinados realizando-se um ajuste da Equação 3.1^{**} aos valores experimentais de elipticidade a 222 nm em função da temperatura, adquiridos na rampa de temperatura crescente, entre 20 °C e 90 °C¹⁹² (Figura 3.20).

$$\text{Sinal observado} = \frac{[\alpha_N + \beta_N(T + 273,15)] + [\alpha_D + \beta_D(T + 273,15)]e^{-\frac{\Delta H_m(1 - \frac{T+273,15}{T_m+273,15})}}{1 + e^{-\frac{\Delta H_m(1 - \frac{T+273,15}{T_m+273,15})}}}{R(T+273,15)} \quad \text{Equação 3.1}$$

em que α_N e α_D representam o sinal da proteína em estudo, respectivamente, nos estados nativo e desnaturado, a 0 K; β_N e β_D , os declives das linhas de base dos estados nativo e desnaturado, a 0 K; T , a temperatura (°C); R , a constante dos gases ideais ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); e ΔH_m , a entalpia de desnaturação à T_m .



^{**} Retirada do protocolo para ajuste de desnaturação de *Biozentrum Biophysics Facility, The Center for Molecular Life Sciences, Universidade da Basileia*, https://www.biozentrum.unibas.ch/research/researchgroups/eigenseiten/unit/bf/?tx_x4epersdb_pi5%5BshowContentPid%5D=6625.

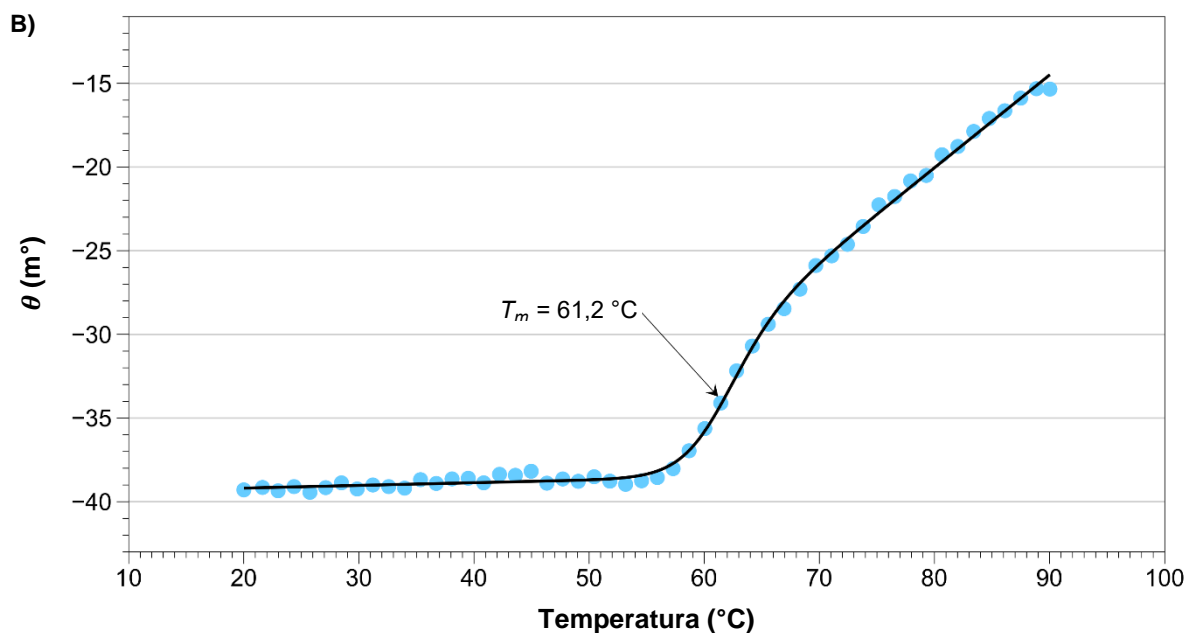


Figura 3.20 – Determinação dos valores das temperaturas de fusão (T_m) para: **A)** o pélete do produto **29** (**29.P**) e **B)** o produto **30**.

As representações dos valores de elipticidade (θ), em função do aumento da temperatura, apresentam comportamentos sigmoidais distintos para as duas amostras consideradas. A descrição dos valores de elipticidade obtidos por curvas sigmoidais é indicativo de que a desnaturação das proteínas ocorre por um processo cooperativo de dois estados com, consequentemente, apenas uma transição de desnaturação e sem intermediários detectáveis¹⁹². Enquanto em **29.P** os valores de elipticidade começam a aumentar assim que se inicia o aumento da temperatura (variando $7,04 m^\circ$); em **30**, os valores de elipticidade mantêm-se constantes até $\sim 55^\circ C$ e aumentam abruptamente até $90^\circ C$ (variando $24,0 m^\circ$), o que sugere uma maior cooperatividade neste caso. Uma vez que **29** e **30** diferem na presença do espaçador **25** e do fotoiniciador **2** e na irradiação a $365 nm$, a variação observada nos comportamentos apresentados pode ser causada por a natureza da ligação cruzada maioritária ser diferente (ligações tioéteres entre o resíduo de aminoácido cisteína e o espaçador, em **29**, e pontes dissulfureto em **30**).

Relativamente aos valores de T_m , para **30** determinou-se o valor de $61,2^\circ C$, enquanto para **29.P** obteve-se um valor inferior em cerca de $8^\circ C$ ($T_m(\text{29.P}) = 53,5^\circ C$), demonstrando uma menor estabilidade da estrutura proteica supramolecular.

3.6.5. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

Por forma a determinar a dimensão das estruturas formadas nos produtos de acoplamento **29**, **32** e **33** e compará-los com o da proteína **23**, analisou-se por DLS **23**, **29.P**, **32.P** e **33.P**, antes e após a incubação com DTT. Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico das partículas e do índice de polidispersividade (PI) obtidos para cada amostra encontram-se indicados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Valores do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersividade (PI), determinados por DLS, para a proteína DpsT10C (**23**) e os péletes dos produtos de acoplamento **29** (**29.P**), **32** (**32.P**) e **33** (**33.P**), antes e após a incubação com DTT.

Proteína	Incubação com DTT		Diâmetro hidrodinâmico ($\bar{x} \pm DP^a$ nm)	PI ($\bar{x} \pm DP^a$)
	[DTT] (mM)	Tempo de incubação		
23	-	-	$8,61 \pm 0,802$	$0,353 \pm 0,193$
29.P	-	-	$34,6 \pm 4,54$	$0,614 \pm 0,118$
	1	5 min	$41,5 \pm 1,60$	$0,469 \pm 0,0177$
		2 h	$31,3 \pm 2,32$	$0,806 \pm 0,0959$
32.P	10	2 h	$46,1 \pm 0,492$	$0,816 \pm 0,0121$
33.P	-	-	$23,4 \pm 2,04$	$0,743 \pm 0,0731$
	1	5 min	$27,4 \pm 3,52$	$0,646 \pm 0,140$
		2 h	$26,5 \pm 3,97$	$0,686 \pm 0,0823$

^a DP: desvio padrão

Das medições de DLS realizadas com a proteína **23** determinou-se um diâmetro hidrodinâmico de $8,61 \pm 0,802$ nm (PI = $0,353 \pm 0,193$). Possuindo a proteína **23** cerca de 9 nm de diâmetro, o valor obtido está de acordo com o referido na literatura (determinado tanto a partir da estrutura cristalográfica¹⁹³ como por DLS¹³⁴). Relativamente aos produtos **29.P**, **32.P** e **33.P**, verifica-se que estes possuem um diâmetro hidrodinâmico superior ao de **23**, resultado do estabelecimento de ligações cruzadas entre as moléculas de proteína.

Tanto no caso de **29.P**, como no caso de **33.P**, a incubação com DTT 1 mM não alterou significativamente os valores dos diâmetros medidos. Em ambas as amostras, os valores obtidos são menores do que o diâmetro de **32.P**, o que está de acordo com as estimativas das percentagens de subunidades ligadas calculadas a partir dos géis SDS-PAGE (Tabela 3.6). Possuindo **29** e **33.P** menos subunidades ligadas entre as proteínas, as estruturas formadas tenderão a ter uma menor dimensão.

No entanto, como, após a incubação com DTT 10 mM, o diâmetro de **32.P** permanece cerca de 5,4 vezes superior ao de **23** e a estimativa da percentagem de subunidades ligadas passa de 73% para 3%, com a adição de β -mercaptoetanol (Tabela 3.6), as condições experimentais

utilizadas podem não ter favorecido a redução de todas as pontes dissulfureto formadas. De facto, a reactividade das pontes dissulfureto com o DTT é dependente da sua exposição ao solvente, sendo mais reactivas as que estão totalmente expostas (reactivas com 0,5 mM de DTT) e não-reactivas as que se encontram protegidas, enterradas na estrutura proteica, só reagindo com o DTT na presença de um agente desnaturante; as parcialmente expostas podem ser reduzidas na presença de 10 mM de DTT¹⁹⁴.

Comparando os valores de PI da proteína **23** com os de **29.P**, **32.P** e **33.P**, os segundos são superiores devido à presença de ligações cruzadas entre as moléculas de proteínas nestas amostras e, conseqüentemente, existirem estruturas supramoleculares de diferentes dimensões, dependente do grau de cruzamento.

3.6.6. Microscopia de força atómica (AFM)

As imagens de AFM em meio líquido foram adquiridas com o intuito de analisar a morfologia das estruturas formadas nas reacções de acoplamento **26c**, **27b**, **29** e **33**, comparando-as com a morfologia de **23**. Todas as imagens foram *plane fitted* para corrigir erros de inclinação do plano de fundo e foram posteriormente processadas com o programa Gwyddion, encontrando-se dispostas nas Figuras 3.21 a 3.25. Nos casos em que as imagens topográficas não permitiram visualizar as estruturas existentes, devido a distorções e artefactos, são apresentadas as imagens de fase correspondentes.

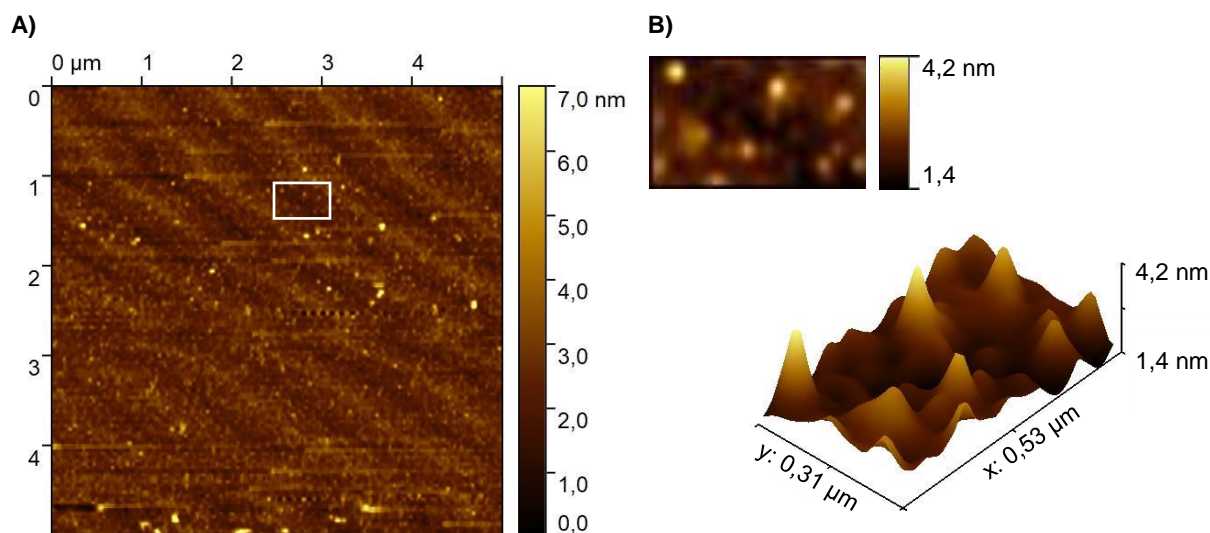


Figura 3.21 – Imagens de AFM da proteína DpsT10C (**23**). **A)** Imagem topográfica. **B)** Ampliação da área assinalada em **A)** e representação tridimensional da mesma.

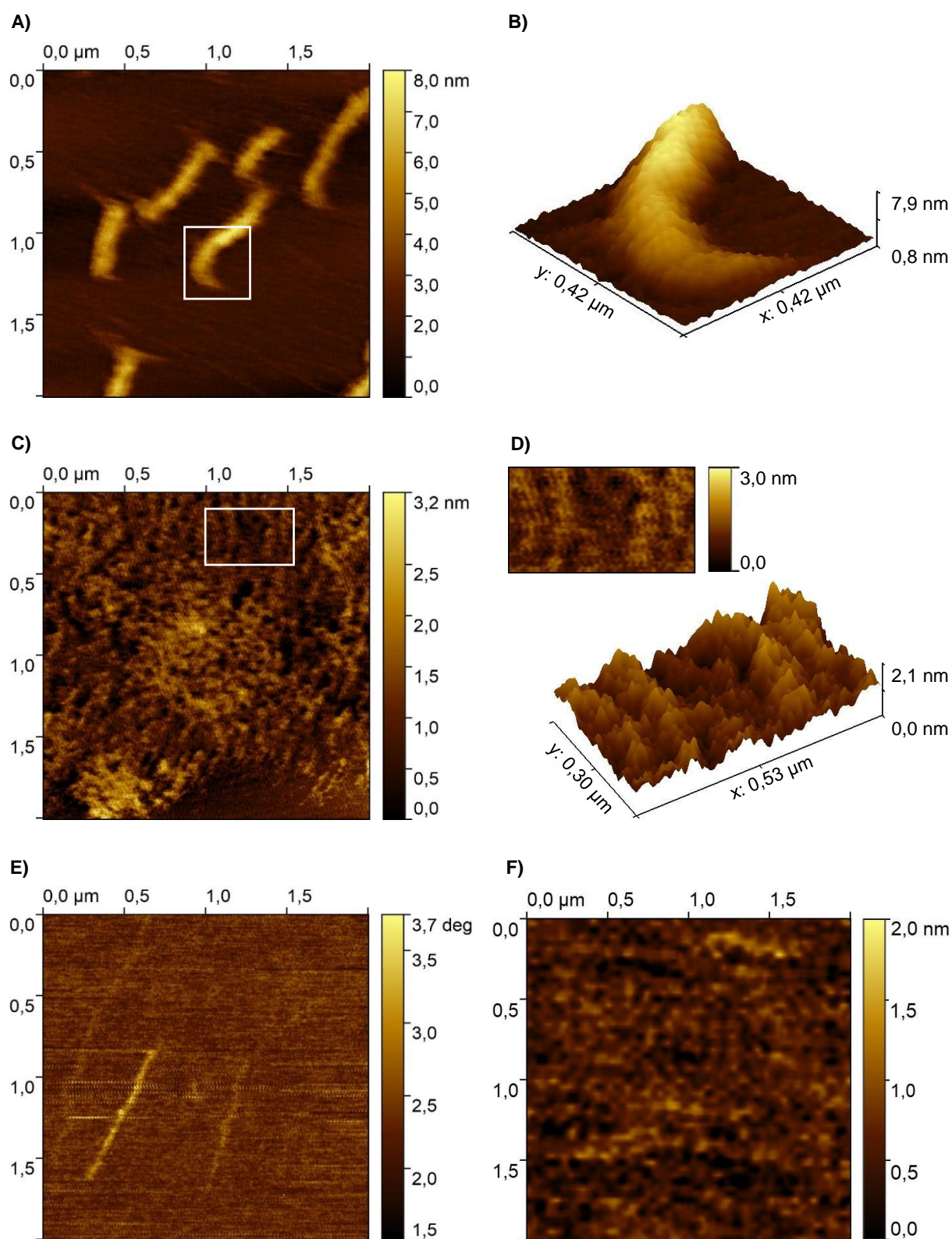


Figura 3.22 – Imagens de AFM do produto 26c. **A), C), E) e F)** Imagens topográficas e de fase antes (**A e C**) e após adição de Fe^{2+} e H_2O_2 (**E e F**). **B) e D)** Ampliações das áreas assinaladas em **A) e C)**, respectivamente, e/ou representações tridimensionais das mesmas.

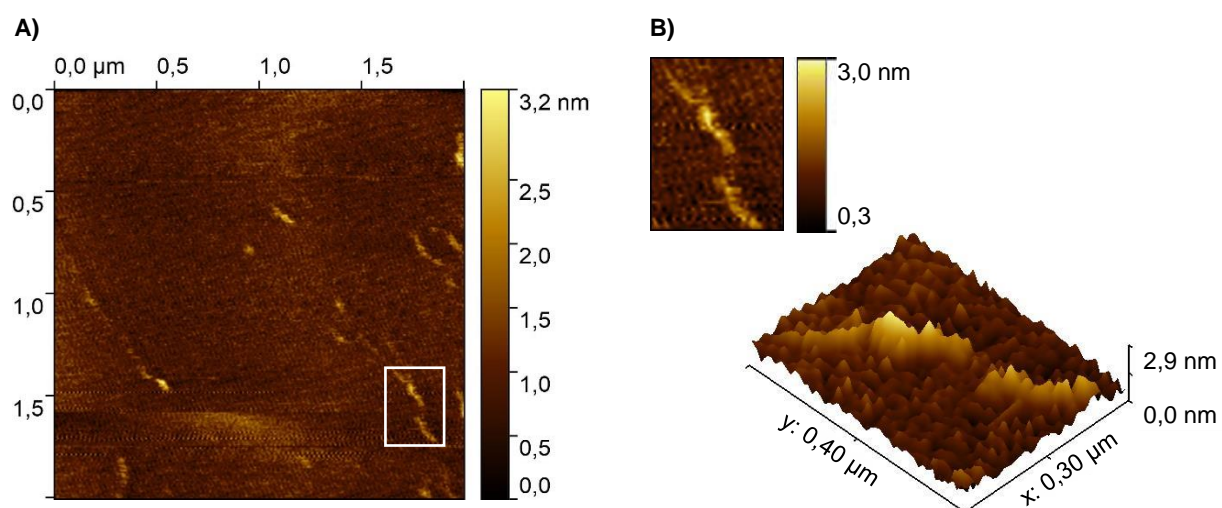
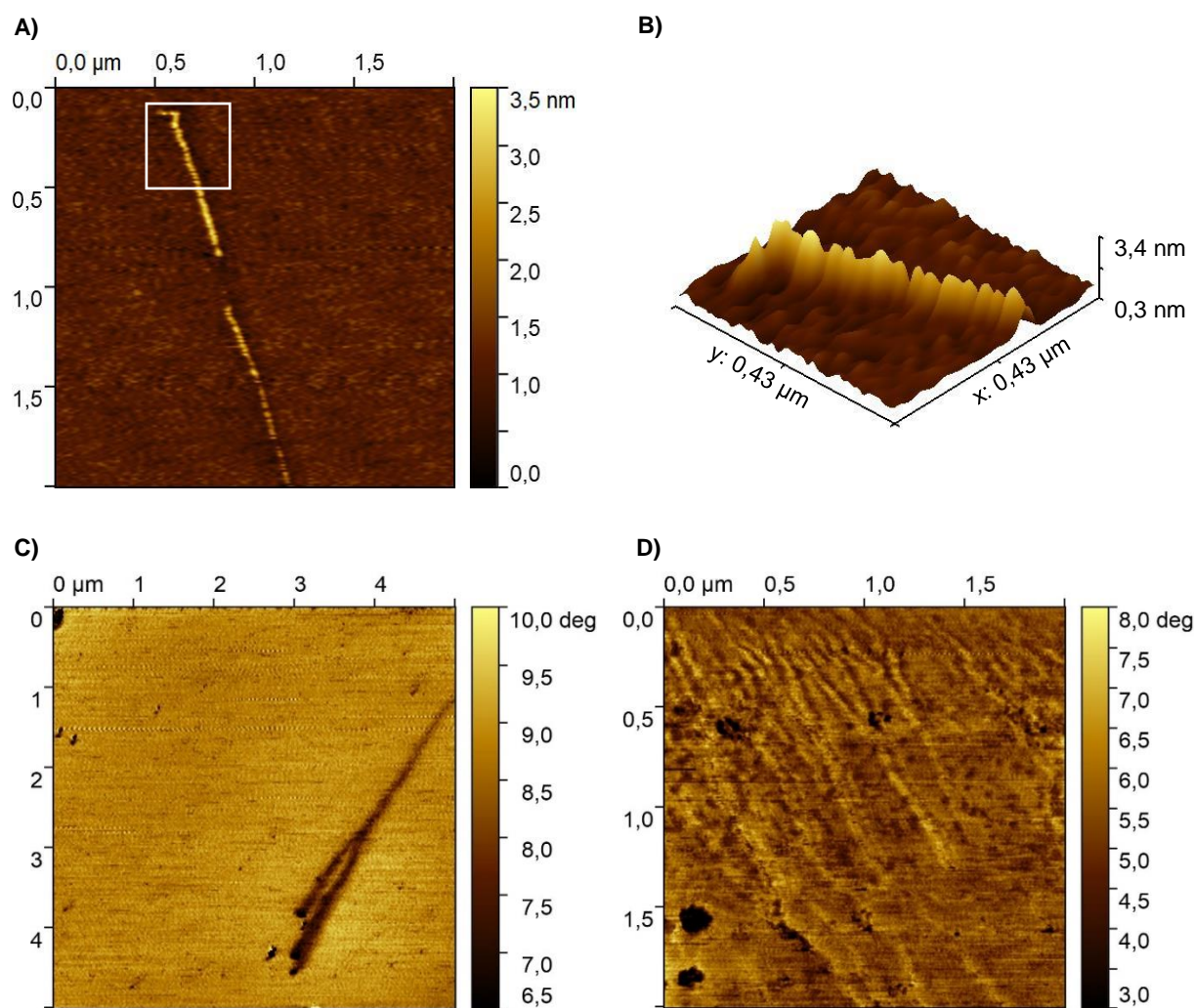


Figura 3.23 – Imagens de AFM do produto **27b**. **A)** Imagem topográfica. **B)** Ampliação da área assinalada em **A)** e representação tridimensional da mesma.



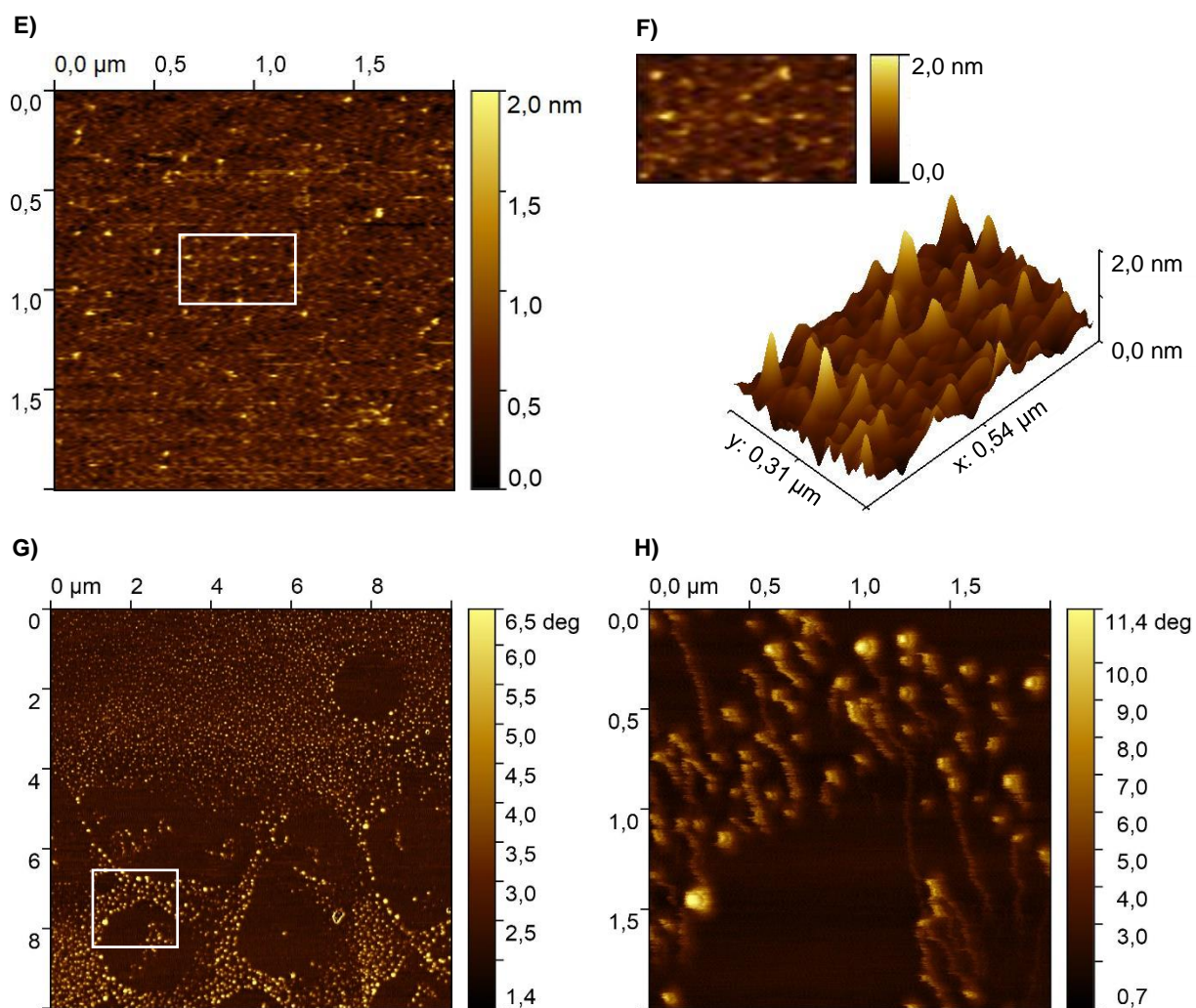


Figura 3.24 – Imagens de AFM do produto 29. A) e E) Imagens topográficas. C), D) e G) Imagens de fase. B), F) e H) Ampliações das áreas assinaladas em A), E) e G), respectivamente, e/ou representações tridimensionais das mesmas.

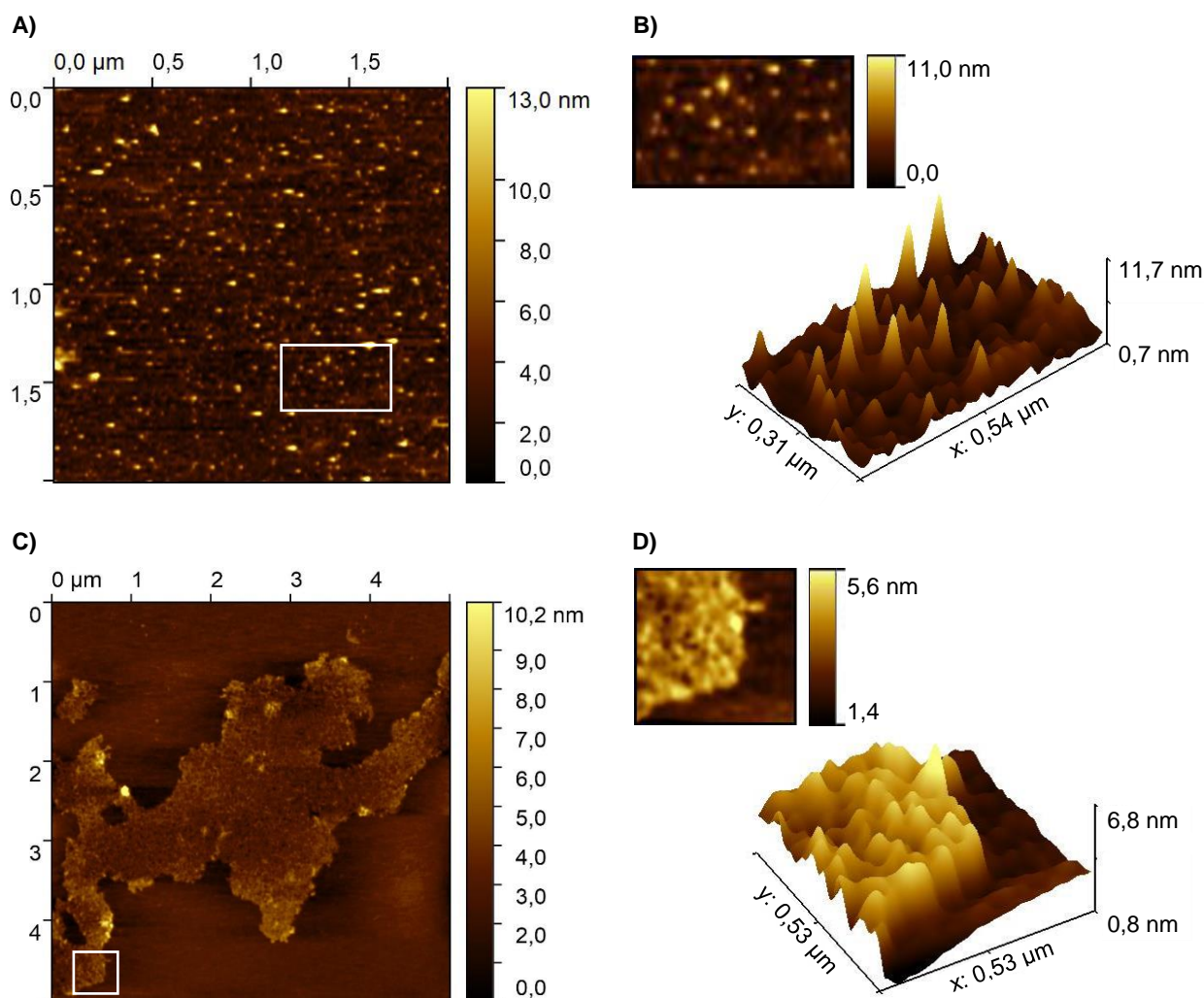


Figura 3.25 – Imagens de AFM dos péletes dos produtos **29 (29.P)** e **33 (33.P)**. **A)** e **C)** Imagens topográficas de **29.P** e **33.P**, na mesma ordem. **B)** e **D)** Ampliações das áreas assinaladas em **A)** e **C)**, respectivamente, e representações tridimensionais das mesmas.

Na Figura 3.21, é possível observar várias partículas com geometria semelhante a esferas correspondentes à proteína **23**. A sua altura possui um valor médio de $6,94 \pm 0,85$ nm ($n = 100$), o que se encontra um pouco abaixo do diâmetro determinado por cristalografia (~ 9 nm¹⁹³). Esta diferença pode ser explicada por distorções da conformação das proteínas causadas pelo estabelecimento de interações com a mica¹⁹⁵, ou pela diminuição da resolução e sensibilidade do modo de contacto intermitente em solução, devido às interações hidrodinâmicas entre o cantiléver e o meio líquido¹⁹⁶.

Com a adição de qualquer um dos espaçadores (Figuras 3.22 a 3.24), as proteínas deixam de ser observadas como esferas individuais para passarem a formar estruturas supramoleculares em forma de fibras longas isoladas e em colónias com aparência semelhante a um coral, com dimensões na ordem dos micrómetros. As representações tridimensionais evidenciam a presença

de unidades constituintes regulares esféricas que se repetem, correspondentes às moléculas de proteína **23** interligadas. A constituição de fibras proteicas (estruturas poliméricas) por um padrão repetitivo análogo pode ser igualmente observado nos filamentos de actina¹⁹⁷, nas fibrilas amilóides de hemoglobina bovina¹⁹⁸ e nos nanofios formados por dímeros de FGG-GST (proteína GST fundida com o tripéptido Fen-Gli-Gli na extremidade N-terminal) unidos por cucurbit[8]uril¹⁹⁹. Nos dois primeiros casos o padrão é gerado pelo passo da hélice do filamento de actina e pelo arranjo espacial dos protofilamentos de hemoglobina, em vez de pelos monómeros de actina e pelas moléculas de hemoglobina que os constituem, enquanto nos nanofios de FGG-GST este deve-se aos dímeros.

Na Figura 3.24 – C, pode-se observar uma ramificação de uma fibra proteica, enquanto na Figura 3.24 – D encontram-se várias fibras com a mesma orientação dispostas lado a lado. Na Figura 3.24 – G e H, é possível observar ainda estruturas globulares na extremidade de cada fibra. Estas estruturas globulares possuem sensivelmente o mesmo diâmetro, ~80 nm, que as extremidades das restantes fibras observadas (Figura 3.24 – C), enquanto a parte interna das fibras apresenta um diâmetro de ~50 nm (Figura 3.24 – C e D). Tendo em conta as imagens de AFM, as fibras observadas podem estar na origem da criação das estruturas semelhantes a um coral, agrupando-se, à semelhança do proposto para os géis formados pela globulina de farelo de arroz¹⁴³ e do observado para as fibrilas amilóides formadas pelo domínio N-terminal da proteína MinE (envolvida na divisão celular em *E. coli*)¹⁹⁶. Estruturas supramoleculares semelhantes, como corais, foram também observadas anteriormente com a proteína Dps, mas envolvendo a organização do DNA de *Mycobacterium smegmatis* em associação com RNA²⁰⁰.

Relativamente à Figura 3.22 – E e F, as imagens de AFM não revelam qualquer alteração na estrutura de coral na presença de ferro.

Quanto ao pélete do produto **29**, a morfologia das estruturas formadas não sofre variação comparativamente à das estruturas visualizadas primeiramente (respectivamente, Figuras 3.25 – A e B e 3.24 – E e F). No caso do pélete de **33** (Figura 3.25 – C e D), as estruturas visualizadas possuem também um aspecto semelhante a coral, pelo que as ligações que não as resultantes do acoplamento tiol-eno não parecem alterar a morfologia das estruturas formadas.

4. Conclusões e perspectivas futuras

As gaiolas proteicas são proteínas extremamente versáteis, quer nas funções que desempenham, quer nas aplicações que podem ter na área da bionanotecnologia. A cavidade interna que possuem confere-lhes vantagem face às demais proteínas, pois providencia um ambiente químico distinto do meio em que se encontram, podendo ser modificada de modo a servir como transportador de compostos, como reactor para reacções químicas ou como molde para a síntese de materiais.

Neste trabalho, pretendeu-se utilizar a proteína mutante DpsT10C como proteína modelo para a preparação de uma estrutura proteica tridimensional supramolecular, do tipo rede, recorrendo à química de clique, mais precisamente aos acoplamentos tiol-eno e tiol-ino, para estabelecer as ligações entre as moléculas de proteína. A cisteína foi escolhida como o aminoácido a modificar devido à elevada nucleofilicidade do grupo sulfidrilo da sua cadeia lateral e à presença de um único resíduo na sequência de cada monómero da proteína homopolimérica (constituída por 12 subunidades idênticas).

Primeiramente, testaram-se, no aminoácido L-cisteína ou em seus derivados, as reacções a aplicar na proteína mutante DpsT10C, permitindo os resultados obtidos inferir que a metodologia utilizada poderia ser aplicada num sistema mais complexo como o da proteína.

A introdução da ligação múltipla carbono-carbono na proteína, para posterior acoplamento, foi inferida através das quantificações dos grupos sulfidrilo ao longo das reacções, por SDS-PAGE e PAGE e confirmada por MALDI-TOF MS no caso do grupo aliolo.

As condições reaccionais suaves, conferidas pelo tipo de química utilizado, permitiram modificar quimicamente as proteínas e acoplá-las entre si sem que a sua estrutura secundária fosse alterada, como demonstrado pelos dados de espectroscopia de CD.

A obtenção de estruturas proteicas supramoleculares artificiais foi confirmada pela existência de ligações não redutíveis entre subunidades, pela presença de estruturas com menor mobilidade electroforética nos géis PAGE, pelo aumento do raio hidrodinâmico (medido por DLS) face à proteína DpsT10C e pelas imagens de AFM em meio líquido. Estas últimas permitiram observar estruturas supramoleculares em forma de fibras, em alguns casos dispostas em colónias com aparência semelhante a um coral, com dimensões na ordem dos micrómetros.

Os ensaios de actividade demonstraram que todas as proteínas funcionalizadas e todas as estruturas supramoleculares analisadas mantiveram a capacidade de oxidar/incorporar ferro, tal como a proteína mutante DpsT10C. Apesar de a actividade de ferroxidação e/ou de mineralização da estrutura cujas ligações foram realizadas por acoplamento tiol-eno, com espaçador de três átomos de carbono, aparentar ter diminuído, quando comparada com a da proteína DpsT10C, a estrutura formada por acoplamento tiol-ino manteve um comportamento semelhante (após a fase

inicial da curva) e a estrutura formada com 1,2-bis(aliloxi)etano apresentou um comportamento catalítico distinto. Esta observação pode ser explicada por uma actividade de oxidação e/ou mineralização mais eficiente (oxidação de iões de ferro ferroso e/ou translocação mais rápida das espécies de ferro férrico formadas no centro activo para o mineral no interior da cavidade) ou pela formação de espécies férricas com coeficientes de absorvidade molar distintos.

O eventual aumento de eficiência no que diz respeito à oxidação e armazenamento de ferro, relativamente à proteína mutante utilizada, revela-se extremamente promissor e permite perspectivar uma possível utilização biotecnológica em biorremediação. Para além desta aplicação, a preparação destas estruturas poderá ainda ser utilizada no campo da medicina (como, por exemplo, transportador de fármacos), da síntese orgânica ou da síntese de novos materiais (como meio reaccional).

5. Referências bibliográficas

- 1 Spicer CD, Davis BG. Selective chemical protein modification. *Nat Commun* 2014; **5**: 4740.
- 2 Krall N, Da Cruz FP, Boutureira O, Bernardes GJL. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat Chem* 2016; **8**: 103–113.
- 3 Davis L, Chin JW. Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 168–182.
- 4 Lang K, Chin JW. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. *Chem Rev* 2014; **114**: 4764–4806.
- 5 Boutureira O, Bernardes GJL. Advances in chemical protein modification. *Chem Rev* 2015; **115**: 2174–2195.
- 6 Johnson JA, Lu YY, Deventer JA Van, Tirrell DA. Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: recent developments and applications. *Curr Opin Chem Biol* 2010; **14**: 774–780.
- 7 Calce E, De Luca S. The cysteine S-alkylation reaction as a synthetic method to covalently modify peptide sequences. *Chem - A Eur J* 2017; **23**: 224–233.
- 8 Dumas A, Lercher L, Spicer CD, Davis BG. Designing logical codon reassignment - expanding the chemistry in biology. *Chem Sci* 2015; **6**: 50–69.
- 9 Chalker JM, Bernardes GJL, Lin YA, Davis BG. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem - An Asian J* 2009; **4**: 630–640.
- 10 Elliott TS, Townsley FM, Bianco A, Ernst RJ, Sachdeva A, Elsässer SJ *et al.* Proteome labeling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 465–472.
- 11 Zeng Y, Wang W, Liu WR. Towards reassigning the rare AGG codon in *Escherichia coli*. *ChemBioChem* 2014; **15**: 1750–1754.
- 12 Neumann H, Wang K, Davis L, Garcia-Alai M, Chin JW. Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* 2010; **464**: 441–444.
- 13 Schneider T, Schneider D, Rösner D, Malhotra S, Mortensen F, Mayer TU *et al.* Dissecting ubiquitin signaling with linkage-defined and protease resistant ubiquitin chains. *Angew Chemie - Int Ed* 2014; **53**: 12925–12929.
- 14 Wan W, Huang Y, Wang Z, Russell WK, Pai PJ, Russell DH *et al.* A facile system for genetic incorporation of two different noncanonical amino acids into one protein in *Escherichia coli*. *Angew Chemie - Int Ed* 2010; **49**: 3211–3214.
- 15 Bischoff R, Schlüter H. Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J Proteomics* 2012; **75**: 2275–2296.
- 16 Kozłowski LP. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res* 2017;

- 45:** D1112–D1116.
- 17 Fodje MN, Al-Karadaghi S. Occurrence, conformational features and amino acid propensities for the π -helix. *Protein Eng Des Sel* 2002; **15**: 353–358.
 - 18 Lee KH, Catherine C, Kim DM. Enhanced production of unnatural amino acid-containing proteins in a cell-free protein synthesis system. *J Ind Eng Chem* 2016; **37**: 90–94.
 - 19 Baumann T, Schmitt F-J, Pelzer A, Spiering VJ, Freiherr Von Sass GJ, Friedrich T *et al.* Engineering ‘golden’ fluorescence by selective pressure incorporation of non-canonical amino acids and protein analysis by mass spectrometry and fluorescence. *J Vis Exp* 2018; : e57017.
 - 20 Völler JS, Thi To TM, Biava H, Koksche B, Budisa N. Global substitution of hemeproteins with noncanonical amino acids in *Escherichia coli* with intact cofactor maturation machinery. *Enzyme Microb Technol* 2017; **106**: 55–59.
 - 21 Cui Z, Mureev S, Polinkovsky ME, Tnimov Z, Guo Z, Durek T *et al.* Combining sense and nonsense codon reassignment for site-selective protein modification with unnatural amino acids. *ACS Synth Biol* 2017; **6**: 535–544.
 - 22 Hohsaka T, Ashizuka Y, Murakami H, Sisido M. Five-base codons for incorporation of nonnatural amino acids into proteins. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 3646–3651.
 - 23 Smolskaya S, Zhang ZJ, Alfonta L. Enhanced yield of recombinant proteins with site-specifically incorporated unnatural amino acids using a cell-free expression system. *PLoS One* 2013; **8**: e68363.
 - 24 Venkat S, Sturges J, Stahman A, Gregory C, Gan Q, Fan C. Genetically incorporating two distinct post-translational modifications into one protein simultaneously. *ACS Synth Biol* 2018; **7**: 689–695.
 - 25 Ho JM, Reynolds NM, Rivera K, Connolly M, Guo LT, Ling J *et al.* Efficient reassignment of a frequent serine codon in wild-type *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 2016; **5**: 163–171.
 - 26 Mukai T, Yamaguchi A, Ohtake K, Takahashi M, Hayashi A, Iraha F *et al.* Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 8111–8122.
 - 27 Niu W, Schultz PG, Guo J. An expanded genetic code in mammalian cells with a functional quadruplet codon. *ACS Chem Biol* 2013; **8**: 1640–1645.
 - 28 Lajoie MJ, Rovner AJ, Goodman DB, Aerni HR, Haimovich AD, Kuznetsov G *et al.* Genomically recoded organisms expand biological functions. *Science* 2013; **342**: 357–360.
 - 29 Zhang Z, Alfonta L, Tian F, Bursulaya B, Uryu S, King DS *et al.* Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 8882–8887.
 - 30 Hassanpour S, Langlotz CP, States U. Genetic code expansion in zebrafish embryos and its

- application to optical control of cell signaling. *J Am Chem Soc* 2017; **139**: 9100–9103.
- 31 Fuentes L, Lebenkoff S, White K, Gerdtz C, Hopkins K, Potter JE *et al*. Chemical evolution of a bacterial proteome. *Angew Chemie - Int Ed* 2015; **54**: 10030–10034.
- 32 Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chemie - Int Ed* 2001; **40**: 2004–2021.
- 33 Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* 2003; **8**: 1128–1137.
- 34 Golas PL, Matyjaszewski K. Marrying click chemistry with polymerization: expanding the scope of polymeric materials. *Chem Soc Rev* 2010; **39**: 1338–1354.
- 35 Muller P. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC recommendations 1994). *Pure Appl Chem* 1994; **66**: 1077–1184.
- 36 Lan Y, Zou L, Cao Y, Houk KN. Computational methods to calculate accurate activation and reaction energies of 1,3-dipolar cycloadditions of 24 1,3-dipoles. *J Phys Chem A* 2011; **115**: 13906–13920.
- 37 Tasdelen MA. Diels-Alder ‘click’ reactions: recent applications in polymer and material science. *Polym Chem* 2011; **2**: 2133–2145.
- 38 Huisgen R. 1,3-Dipolar cycloadditions: past and future. *Angew Chemie Int Ed English* 1963; **2**: 565–598.
- 39 Tietze LF, Kettschau G. Hetero Diels-Alder reactions in organic chemistry. In: Metz P (ed). *Stereoselective heterocyclic synthesis I: topics in current chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, pp 1–120.
- 40 Gupta S, Sen, Raja KS, Kaltgrad E, Strahle E, Finn MG. Virus-glycopolymer conjugates by copper(I) catalysis of atom transfer radical polymerization and azide-alkyne cycloaddition. *Chem Commun* 2005; **0**: 4315–4317.
- 41 Anami Y, Yamazaki CM, Xiong W, Gui X, Zhang N, An Z *et al*. Glutamic acid-valine-citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody-drug conjugates in mice. *Nat Commun* 2018; **9**: 2512.
- 42 Finbloom JA, Han K, Slack CC, Furst AL, Francis MB. Cucurbit[6]uril-promoted click chemistry for protein modification. *J Am Chem Soc* 2017; **139**: 9691–9697.
- 43 Temming RP, Eggermont L, Van Eldijk MB, Van Hest JCM, Van Delft FL. N-terminal dual protein functionalization by strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition. *Org Biomol Chem* 2013; **11**: 2772–2779.
- 44 Song W, Wang Y, Qu J, Madden MM, Lin Q. A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins. *Angew Chemie - Int Ed* 2008; **47**: 2832–2835.
- 45 Lee YJ, Wu B, Raymond JE, Zeng Y, Fang X, Wooley KL *et al*. A genetically encoded

- acrylamide functionality. *ACS Chem Biol* 2013; **8**: 1664–1670.
- 46 Wang XS, Leea Y-J, Liu WR. The nitrilimine-alkene cycloaddition is an ultra rapid click reaction. *Chem Commun* 2014; **50**: 3176–3179.
- 47 Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* 2002; **67**: 3057–3064.
- 48 Rostovtsev V V, Green LG, Fokin V V, Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed* 2002; **41**: 2596–2599.
- 49 Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - new insights and applications. *Metallomics* 2011; **3**: 1109–1118.
- 50 Codelli JA, Baskin JM, Agard NJ, Bertozzi CR. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J Am Chem Soc* 2008; **130**: 11486–11493.
- 51 Eising S, Lelivelt F, Bongers KM. Vinylboronic acids as fast reacting, synthetically accessible, and stable bioorthogonal reactants in the Carboni–Lindsey reaction. *Angew Chemie - Int Ed* 2016; **55**: 12243–12247.
- 52 Eising S, Van Der Linden NGA, Kleinpenning F, Bongers KM. Vinylboronic acids as efficient bioorthogonal reactants for tetrazine labeling in living cells. *Bioconjug Chem* 2018; **29**: 982–986.
- 53 Eising S, Xin BT, Kleinpenning F, Heming JJA, Florea BI, Overkleeft HS *et al.* Coordination-assisted bioorthogonal chemistry: orthogonal tetrazine ligation with vinylboronic acid and a strained alkene. *ChemBioChem* 2018; **19**: 1648–1652.
- 54 Li Q, Dong T, Liu X, Lei X. A bioorthogonal ligation enabled by click cycloaddition of *o*-quinolinone quinone methide and vinyl thioether. *J Am Chem Soc* 2013; **135**: 4996–4999.
- 55 Hooker JM, Kovacs EW, Francis MB. Interior surface modification of bacteriophage MS2. *J Am Chem Soc* 2004; **126**: 3718–3719.
- 56 Jouanno L-A, Chevalier A, Sekkat N, Perzo N, Castel H, Romieu A *et al.* Kondrat’eva ligation: Diels–Alder-based irreversible reaction for bioconjugation. *J Org Chem* 2014; **79**: 10353–10366.
- 57 Fu GC. Transition-metal catalysis of nucleophilic substitution reactions: a radical alternative to S_N1 and S_N2 processes. *ACS Cent Sci* 2017; **3**: 692–700.
- 58 Takaoka Y, Tsutsumi H, Kasagi N, Nakata E, Hamachi I. One-pot and sequential organic chemistry on an enzyme surface to tether a fluorescent probe at the proximity of the active site with restoring enzyme activity. *J Am Chem Soc* 2006; **128**: 3273–3280.
- 59 Wakabayashi H, Miyagawa M, Koshi Y, Takaoka Y, Tsukiji S, Hamachi I. Affinity-labeling-based introduction of a reactive handle for natural protein modification.

- Chem - An Asian J* 2008; **3**: 1134–1139.
- 60 Huang R, Holbert MA, Tarrant MK, Curtet S, Colquhoun DR, Dancy BM *et al.* Site-specific introduction of an acetyl-lysine mimic into peptides and proteins by cysteine alkylation. *J Am Chem Soc* 2010; **132**: 9986–9987.
- 61 Mhida R, Vallin A, Ollivier N, Blanpain A, Shi G, Christiano R *et al.* Synthesis of peptide-protein conjugates using *N*-succinimidyl carbamate chemistry. *Bioconjug Chem* 2010; **21**: 219–228.
- 62 Cooper MS, Ma MT, Sunassee K, Shaw KP, Williams JD, Paul RL *et al.* Comparison of ⁶⁴Cu-complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity, and *in vitro/in vivo* stability. *Bioconjug Chem* 2012; **23**: 1029–1039.
- 63 Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Futur Oncol* 2015; **11**: 1327–1342.
- 64 Lopez-Olivo MA, Amezaga Urruela M, McGahan L, Pollono EN, Suarez-Almazor ME. Rituximab for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; **2**: 99–111.
- 65 Yi L, Sun H, Wu Y-W, Triola G, Waldmann H, Goody RS. A highly efficient strategy for modification of proteins at the C terminus. *Angew Chemie Int Ed* 2010; **49**: 9417–9421.
- 66 Nisal R, Jose G, Shanbhag C, Kalia J. Rapid and reversible hydrazone bioconjugation in cells without the use of extraneous catalysts. *Org Biomol Chem* 2018; **16**: 4304–4310.
- 67 Kim D, Ma D, Kim M, Jung Y, Kim NH, Lee C *et al.* Fluorescent labeling of protein using blue-emitting 8-amino-BODIPY derivatives. *J Fluoresc* 2017; **27**: 2231–2238.
- 68 Wang Y, Gao H, Na XL, Dong SY, Dong HW, Yu J *et al.* Aniline induces oxidative stress and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health* 2016; **13**: 1188.
- 69 Holme A, Sæthre LJ, Børve KJ, Thomas TD. Chemical reactivity of alkenes and alkynes as seen from activation energies, enthalpies of protonation, and carbon 1s ionization energies. *J Org Chem* 2012; **77**: 10105–10117.
- 70 Huang H, Zhou Y, Liu H. Recent advances in the gold-catalyzed additions to C-C multiple bonds. *Beilstein J Org Chem* 2011; **7**: 897–936.
- 71 Massi A, Nanni D. Thiol-yne coupling: revisiting old concepts as a breakthrough for up-to-date applications. *Org Biomol Chem* 2012; **10**: 3791–3807.
- 72 Rulev AY. Aza-Michael reaction: achievements and prospects. *Russ Chem Rev* 2011; **80**: 197–218.
- 73 Gattner MJ, Ehrlich M, Vrabel M. Sulfonyl azide-mediated norbornene aziridination for orthogonal peptide and protein labeling. *Chem Commun* 2014; **50**: 12568–12571.
- 74 Matos MJ, Oliveira BL, Martínez-Sáez N, Guerreiro A, Cal PMSD, Bertoldo J *et al.* Chemo- and regioselective lysine modification on native proteins. *J Am Chem Soc* 2018; **140**: 4004–4017.

- 75 Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK *et al.* A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* 2008; **452**: 755–758.
- 76 Lee YJ, Kurra Y, Liu WR. Phospha-Michael addition as a new click reaction for protein functionalization. *ChemBioChem* 2016; **17**: 456–461.
- 77 Shinmi D, Taguchi E, Iwano J, Yamaguchi T, Masuda K, Enokizono J *et al.* One-step conjugation method for site-specific antibody-drug conjugates through reactive cysteine-engineered antibodies. *Bioconjug Chem* 2016; **27**: 1324–1331.
- 78 Shen BQ, Xu K, Liu L, Raab H, Bhakta S, Kenrick M *et al.* Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 184–189.
- 79 Bernardim B, Cal PMSD, Matos MJ, Oliveira BL, Martínez-Saéz N, Albuquerque IS *et al.* Stoichiometric and irreversible cysteine-selective protein modification using carbonylacrylic reagents. *Nat Commun* 2016; **7**: 13128.
- 80 Darby JF, Atobe M, Firth JD, Bond P, Davies GJ, O'Brien P *et al.* Increase of enzyme activity through specific covalent modification with fragments. *Chem Sci* 2017; **8**: 7772–7779.
- 81 Slavin S, Khoshdel E, Haddleton DM. Biological surface modification by 'thiol-ene' addition of polymers synthesised by catalytic chain transfer polymerisation (CCTP). *Polym Chem* 2012; **3**: 1461–1466.
- 82 Lin YA, Boutureira O, Lercher L, Bhushan B, Paton RS, Davis BG. Rapid cross-metathesis for reversible protein modifications via chemical access to Se-allyl-selenocysteine in proteins. *J Am Chem Soc* 2013; **135**: 12156–12159.
- 83 Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W *et al.* Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017; **377**: 829–838.
- 84 Buckel L, Savariar EN, Crisp JL, Jones KA, Angel M, Scanderbeg DJ *et al.* Tumor radiosensitization by monomethyl auristatin E: mechanism of action and targeted delivery. *Cancer Res* 2015; **75**: 1376–1387.
- 85 Valkevich EM, Guenette RG, Sanchez NA, Chen Y, Ge Y, Strieter ER. Forging isopeptide bonds using thiol-ene chemistry: site-specific coupling of ubiquitin molecules for studying the activity of isopeptidases. *J Am Chem Soc* 2012; **134**: 6916–6919.
- 86 Cramer NB, Scott JP, Bowman CN. Photopolymerizations of thiol-ene polymers without photoinitiators. *Macromolecules* 2002; **35**: 5361–5365.
- 87 Weinrich D, Lin P-C, Jonkheijm P, Nguyen UTT, Schröder H, Niemeyer CM *et al.* Oriented immobilization of farnesylated proteins by the thiol-ene reaction. *Angew Chemie - Int Ed* 2010; **49**: 1252–1257.
- 88 Wilke KE, Carlson EE. Thiol-ene-enabled detection of thiophosphorylation as a labeling

- strategy for phosphoproteins. In: Stechow L von (ed). *Phospho-proteomics: methods and protocols*. Humana Press, 2016, pp 3–15.
- 89 Torres-Kolbus J, Chou C, Liu J, Deiters A. Synthesis of non-linear protein dimers through a genetically encoded thiol-ene reaction. *PLoS One* 2014; **9**: e105467.
 - 90 Oberleitner B, Dellinger A, Déforet M, Galtayries A, Castanetd A-S, Semetey V. A facile and versatile approach to design self-assembled monolayers on glass using thiol-ene chemistry. *Chem Commun* 2013; **49**: 1615–1617.
 - 91 Rojas-Ocáriz V, Compañón I, Aydillo C, Castro-López J, Jimenez-Barbero J, Hurtado-Guerrero R *et al.* Design of α -S-neoglycopeptides derived from MUC1 with a flexible and solvent exposed sugar moiety. *J Org Chem* 2016; **81**: 5929–5941.
 - 92 Conte M Lo, Staderini S, Marra A, Sanchez-Navarro M, Davis BG, Dondoni A. Multi-molecule reaction of serum albumin can occur through thiol-yne coupling. *Chem Commun* 2011; **47**: 11086–11088.
 - 93 Floyd N, Vijayakrishnan B, Koeppe JR, Davis BG. Thiyl glycosylate of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis. *Angew Chemie - Int Ed* 2009; **48**: 7798–7802.
 - 94 Grayson EJ, Bernardes GJL, Chalker JM, Boutureira O, Koeppe JR, Davis BG. A coordinated synthesis and conjugation strategy for the preparation of homogeneous glycoconjugate vaccine candidates. *Angew Chemie - Int Ed* 2011; **50**: 4127–4132.
 - 95 Heddle JG. Protein cages, rings and tubes: useful components of future nanodevices? *Nanotechnol Sci Appl* 2008; **1**: 67–78.
 - 96 Putri RM, Cornelissen JJLM, Koay MST. Self-assembled cage-like protein structures. *ChemPhysChem* 2015; **16**: 911–918.
 - 97 Rother M, Nussbaumer MG, Renggli K, Bruns N. Protein cages and synthetic polymers: a fruitful symbiosis for drug delivery applications, bionanotechnology and materials science. *Chem Soc Rev* 2016; **45**: 6213–6249.
 - 98 Pieters BJGE, van Eldijk MB, Nolte RJM, Mecnović J. Natural supramolecular protein assemblies. *Chem Soc Rev* 2016; **45**: 24–39.
 - 99 Andrews SC. The ferritin-like superfamily: evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2010; **1800**: 691–705.
 - 100 Le Brun NE, Crow A, Murphy MEP, Mauk AG, Moore GR. Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2010; **1800**: 732–744.
 - 101 Crichton RR, Declercq J-P. X-ray structures of ferritins and related proteins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2010; **1800**: 706–718.
 - 102 Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2010; **1800**: 719–731.
 - 103 Haikarainen T, Papageorgiou AC. Dps-like proteins: structural and functional insights into

- a versatile protein family. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 341–351.
- 104 Chiancone E, Ceci P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2010; **1800**: 798–805.
 - 105 Allen M, Willits D, Mosolf J, Young M, Douglas T. Protein cage constrained synthesis of ferrimagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Mater* 2002; **14**: 1562–1565.
 - 106 Uchida M, Flenniken ML, Allen M, Willits DA, Crowley BE, Brumfield S *et al.* Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2006; **128**: 16626–16633.
 - 107 Fantechi E, Innocenti C, Zanardelli M, Fittipaldi M, Falvo E, Carbo M *et al.* A smart platform for hyperthermia application in cancer treatment: cobalt-doped ferrite nanoparticles mineralized in human ferritin cages. *ACS Nano* 2014; **8**: 4705–4719.
 - 108 Cai Y, Cao C, He X, Yang C, Tian L, Zhu R *et al.* Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *Int J Nanomedicine* 2015; **10**: 2619–2634.
 - 109 Li M, Viravaidya C, Mann S. Polymer-mediated synthesis of ferritin-encapsulated inorganic nanoparticles. *Small* 2007; **3**: 1477–1481.
 - 110 Okuda M, Iwahori K, Yamashita I, Yoshimura H. Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin. *Biotechnol Bioeng* 2003; **84**: 187–194.
 - 111 Sana B, Poh CL, Lim S. A manganese-ferritin nanocomposite as an ultrasensitive T_2 contrast agent. *Chem Commun* 2012; **48**: 862–864.
 - 112 Douglas T, Stark VT. Nanophase cobalt oxyhydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin. *Inorg Chem* 2000; **39**: 1828–1830.
 - 113 Yamashita I, Kirimura H, Okuda M, Nishio K, Sano K-I, Shiba K *et al.* Selective nanoscale positioning of ferritin and nanoparticles by means of target-specific peptides. *Small* 2006; **2**: 1148–1152.
 - 114 Kirimura H, Uraoka Y, Fuyuki T, Okuda M, Yamashita I. Study of low-temperature crystallization of amorphous Si films obtained using ferritin with Ni nanoparticles. *Appl Phys Lett* 2005; **86**: 262106.
 - 115 Iwahori K, Yoshizawa K, Muraoka M, Yamashita I. Fabrication of ZnSe nanoparticles in the apoferritin cavity by designing a slow chemical reaction system. *Inorg Chem* 2005; **44**: 6393–6400.
 - 116 Ueno T, Suzuki M, Goto T, Matsumoto T, Nagayama K, Watanabe Y. Size-selective olefin hydrogenation by a Pd nanocluster provided in an apo-ferritin cage. *Angew Chemie - Int Ed* 2004; **43**: 2527–2530.
 - 117 Kramer RM, Li C, Carter DC, Stone MO, Naik RR. Engineered protein cages for nanomaterial

- synthesis. *J Am Chem Soc* 2004; **126**: 13282–13286.
- 118 Yamashita I, Hayashi J, Hara M. Bio-template synthesis of uniform CdSe nanoparticles using cage-shaped protein, apoferritin. *Chem Lett* 2004; **33**: 1158–1159.
 - 119 Yoshizawa K, Iwahori K, Sugimoto K, Yamashita I. Fabrication of gold sulfide nanoparticles using the protein cage of apoferritin. *Chem Lett* 2006; **35**: 1192–1193.
 - 120 Sun C, Yang H, Yuan Y, Tian X, Wang L, Guo Y *et al.* Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for in vivo kidney targeting and biomedical imaging. *J Am Chem Soc* 2011; **133**: 8617–8624.
 - 121 Valero E, Fiorini S, Tambalo S, Busquier H, Callejas-Fernández J, Marzola P *et al.* In vivo long-term magnetic resonance imaging activity of ferritin-based magnetic nanoparticles versus a standard contrast agent. *J Med Chem* 2014; **57**: 5686–5692.
 - 122 Bonard J-M, Chauvin P, Klinke C. Monodisperse multiwall carbon nanotubes obtained with ferritin as catalyst. *Nano Lett* 2002; **2**: 665–667.
 - 123 Matsukawa N, Nishio K, Sano K, Shiba K, Yamashita I. Hexagonal close-packed array formed by selective adsorption onto hexagonal patterns. *Langmuir* 2009; **25**: 3327–3330.
 - 124 Kumagai S, Yoshii S, Yamada K, Matsukawa N, Fujiwara I, Iwahori K *et al.* Electrostatic placement of single ferritin molecules. *Appl Phys Lett* 2006; **88**: 153103.
 - 125 Uto K, Yamamoto K, Kishimoto N, Muraoka M, Aoyagi T, Yamashita I. Precise control of two-dimensional composition of proteins and nanoparticle conjugate for functional nanostructured material fabrication. *J Colloid Interface Sci* 2012; **378**: 44–50.
 - 126 Zhang C, Shang J, Xue W, Tan H, Pan L, Yang X *et al.* Convertible resistive switching characteristics between memory switching and threshold switching in a single ferritin-based memristor. *Chem Commun* 2016; **52**: 4828–4831.
 - 127 Kim BJ, Ko Y, Cho JH, Cho J. Organic field-effect transistor memory devices using discrete ferritin nanoparticle-based gate dielectrics. *Small* 2013; **9**: 3784–3791.
 - 128 Zhen Z, Tang W, Chen H, Lin X, Todd T, Wang G *et al.* RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors. *ACS Nano* 2013; **7**: 4830–4837.
 - 129 Yang Z, Wang X, Diao H, Zhang J, Li H, Sun H *et al.* Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem Commun* 2007; **0**: 3453–3455.
 - 130 Zhen Z, Tang W, Guo C, Chen H, Lin X, Liu G *et al.* Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer. *ACS Nano* 2013; **7**: 6988–6996.
 - 131 Zhen Z, Tang W, Zhang W, Xie J. Folic acid conjugated ferritins as photosensitizer carriers for photodynamic therapy. *Nanoscale* 2015; **7**: 10330–10333.
 - 132 Broomell CC, Birkedal H, Oliveira CLP, Pedersen JS, Gertenbach J-A, Young M *et al.* Protein cage nanoparticles as secondary building units for the synthesis of 3-dimensional

- coordination polymers. *Soft Matter* 2010; **6**: 3167–3171.
- 133 Rossmann MG, Mesyanzhinov V V, Arisaka F, Leiman PG. The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* 2004; **14**: 171–180.
- 134 Sugimoto K, Kanamaru S, Iwasaki K, Arisaka F, Yamashita I. Construction of a ball-and-spike protein supramolecule. *Angew Chemie - Int Ed* 2006; **45**: 2725–2728.
- 135 Azamian BR, Davis JJ, Coleman KS, Bagshaw CB, Green MLH. Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2002; **124**: 12664–12665.
- 136 Lin Y, Allard LF, Sun Y-P. Protein-affinity of single-walled carbon nanotubes in water. *J Phys Chem B* 2004; **108**: 3760–3764.
- 137 Zhang S, Zang J, Wang W, Chen H, Zhang X, Wang F *et al*. Conversion of the native 24-mer ferritin nanocage into its non-native 16-mer analogue by insertion of extra amino acid residues. *Angew Chemie - Int Ed* 2016; **55**: 16064–16070.
- 138 Swift J, Wehbi WA, Kelly BD, Stowell XF, Saven JG, Dmochowski IJ. Design of functional ferritin-like proteins with hydrophobic cavities. *J Am Chem Soc* 2006; **128**: 6611–6619.
- 139 Maity B, Abe S, Ueno T. Observation of gold sub-nanocluster nucleation within a crystalline protein cage. *Nat Commun* 2017; **8**: 14820.
- 140 Kostiaainen MA, Hiekkataipale P, Laiho A, Lemieux V, Seitsonen J, Ruokolainen J *et al*. Electrostatic assembly of binary nanoparticle superlattices using protein cages. *Nat Nanotechnol* 2013; **8**: 52–56.
- 141 Liljeström V, Mikkilä J, Kostiaainen MA. Self-assembly and modular functionalization of three-dimensional crystals from oppositely charged proteins. *Nat Commun* 2014; **5**: 4445.
- 142 Kostiaainen MA, Kasyutich O, Cornelissen JJLM, Nolte RJM. Self-assembly and optically triggered disassembly of hierarchical dendron-virus complexes. *Nat Chem* 2010; **2**: 394–399.
- 143 Huang L, Zhang Y, Li H. Self-assembly of globulin nanofibrils at various ionic strength: microstructure and gels. *Am J Nanomater* 2014; **2**: 8–12.
- 144 Tang S, Glassman MJ, Li S, Socrate S, Olsen BD. Oxidatively responsive chain extension to entangle engineered protein hydrogels. *Macromolecules* 2014; **47**: 791–799.
- 145 Tang S, Olsen BD. Controlling topological entanglement in engineered protein hydrogels with a variety of thiol coupling chemistries. *Front Chem* 2014; **2**: 23.
- 146 Madl CM, Heilshorn SC. Tyrosine-selective functionalization for bio-orthogonal cross-linking of engineered protein hydrogels. *Bioconjug Chem* 2017; **28**: 724–730.
- 147 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC *et al*. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004; **25**: 1605–1612.
- 148 Arnold K, Xenarios I, de Castro E, Fortier A, Gasteiger E, Redaschi N *et al*. ExPASy: SIB

- bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: W597–W603.
- 149 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
 - 150 Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 2002; **373**: 266–276.
 - 151 Sharma K, Laurens JB, Pilcher LA. Stereoselective synthesis of the urinary metabolite *N*-acetyl-S-(3,4-dihydroxybutyl)cysteine. *Synth Commun* 2009; **39**: 1415–1424.
 - 152 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 676–682.
 - 153 Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 671–675.
 - 154 Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 2015; **82**: 518–529.
 - 155 Timóteo CG, Guilherme M, Penas D, Folgosa F, Tavares P, Pereira AS. *Desulfovibrio vulgaris* bacterioferritin uses H₂O₂ as a co-substrate for iron oxidation and reveals DPS-like DNA protection and binding activities. *Biochem J* 2012; **446**: 125–133.
 - 156 Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 2005; **1751**: 119–139.
 - 157 Miles AJ, Wallace BA. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem Soc Rev* 2006; **35**: 39–51.
 - 158 Lobley A, Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 2002; **18**: 211–212.
 - 159 Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: W668–W673.
 - 160 Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 2008; **89**: 392–400.
 - 161 Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 2000; **287**: 252–260.
 - 162 Lees JG, Miles AJ, Wien F, Wallace BA. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* 2006; **22**: 1955–1962.
 - 163 Frishman D, Argos P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins Struct Funct Genet* 1995; **23**: 566–579.

- 164 Kormos BL, Cramer CJ. Solvation effects on alternative nucleophilic substitution reaction paths for chloride/allyl chloride and γ -methylated congeners. *J Org Chem* 2003; **68**: 6375–6386.
- 165 Emer E, Sinisi R, Capdevila MG, PetruzzIELLO D, De Vincentiis F, Cozzi PG. Direct nucleophilic S_N1-type reactions of alcohols. *European J Org Chem* 2011; **2011**: 647–666.
- 166 Bagiyani GA, Koroleva IK, Soroka N V, Ufimtsev A V. Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions. *Russ Chem Bull Int Ed* 2003; **52**: 1135–1141.
- 167 Wu C-H, Galabov B, Wu JI-C, Ilieva S, Schleyer PVR, Allen WD. Do π -conjugative effects facilitate S_N2 reactions? *J Am Chem Soc* 2014; **136**: 3118–3126.
- 168 Johnston HJ, Hulme AN. A facile, inexpensive and scalable route to thiol-protected α -methyl cysteine. *Synlett* 2013; **24**: 591–594.
- 169 Pinto LD, Puppini PAL, Behring VM, Flinker DH, Mercê ALR, Mangrich AS *et al.* Solution and solid state study of copper(II) ternary complexes containing amino acids of interest for brain biochemistry - 1: aspartic or glutamic acids with methionine or cysteine. *Inorganica Chim Acta* 2010; **363**: 2624–2630.
- 170 Faget O G, Felcman J, Giannerini T, Téllez S CA. Fourier-transform infrared and Raman spectra of cysteine dichloride cadmium(II) anion DFT: B3LYP/3-21G(d) structural and vibrational calculations. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2005; **61**: 2121–2129.
- 171 Socrates G. *Infrared and raman characteristic group frequencies*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2004.
- 172 Shurvell HF. Spectra–structure correlations in the mid- and far-infrared. In: Griffiths P, Chalmers JM (eds). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2006, pp 1783–1816.
- 173 Cacciatore I, Di Giulio M, Fornasari E, Di Stefano A, Cerasa LS, Marinelli L *et al.* Carvacrol codrugs: a new approach in the antimicrobial plan. *PLoS One* 2015; **10**: e0120937.
- 174 Majima T, Schnabel W. Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinates as water-soluble photoinitiators. Generation and reactivity of O=P(C₆H₅)(O[•]) radical anions. *Makromol Chemie* 1991; **192**: 2307–2315.
- 175 Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* 2009; **30**: 6702–6707.
- 176 Pereira AS, Tavares P, Lloyd SG, Danger D, Edmondson DE, Theil EC *et al.* Rapid and parallel formation of Fe³⁺ multimers, including a trimer, during H-type subunit ferritin mineralization. *Biochemistry* 1997; **36**: 7917–7927.
- 177 Monopoli A, Cotugno P, Cortese M, Calvano CD, Ciminale F, Nacci A. Selective N-alkylation

- of arylamines with alkyl chloride in ionic liquids: scope and applications. *European J Org Chem* 2012; **2012**: 3105–3111.
- 178 Liu H, Liu J, Cheng X, Jia X, Yu L, Xu Q. DMSO-triggered complete oxygen transfer leading to accelerated aqueous hydrolysis of organohalides under mild conditions. *ChemSusChem* 2018. doi:10.1002/cssc.201802138.
 - 179 Cataldo F, Iglesias-Groth S. On the action of UV photons on hydrogenated fullerenes C₆₀H₃₆ and C₆₀D₃₆. *Mon Not R Astron Soc* 2009; **400**: 291–298.
 - 180 Ranu BC, Mandal T. Water-promoted highly selective anti-Markovnikov addition of thiols to unactivated alkenes. *Synlett* 2007; **6**: 925–928.
 - 181 Lenardão EJ, Jacob RG, Mesquita KD, Lara RG, Webber R, Martinez DM *et al.* Glycerol as a promoting and recyclable medium for catalyst-free synthesis of linear thioethers: new antioxidants from eugenol. *Green Chem Lett Rev* 2013; **6**: 269–276.
 - 182 Basu B, Biswas K, Kundu S, Sengupta D. In quest of “stereoselective switch” for on-water hydrothiolation of terminal alkynes using different additives and green synthesis of vicinal dithioethers. *Org Chem Int* 2014; **2014**: 1–6.
 - 183 Jin Z, Xu B, Hammond GB. Green synthesis of vicinal dithioethers and alkenyl thioethers from the reaction of alkynes and thiols in water. *European J Org Chem* 2010; **2010**: 168–173.
 - 184 Bhadra S, Ranu BC. Water-promoted regioselective hydrothiolation of alkynes. *Can J Chem* 2009; **87**: 1605–1609.
 - 185 Nauser T, Casi G, Koppenol WH, Schöneich C. Intramolecular addition of cysteine thiyl radicals to phenylalanine in peptides: Formation of cyclohexadienyl type radicals. *Chem Commun* 2005; **0**: 3400–3402.
 - 186 Naumov S, Schöneich C. Intramolecular addition of cysteine thiyl radical to phenylalanine and tyrosine in model peptides, Phe (CysS•) and Tyr(CysS•): a computational study. *J Phys Chem A* 2009; **113**: 3560–3565.
 - 187 Mozziconacci O, Williams TD, Kerwin BA, Schöneich C. Reversible intramolecular hydrogen transfer between protein cysteine thiyl radicals and αC-H bonds in insulin: control of selectivity by secondary structure. *J Phys Chem B* 2008; **112**: 15921–15932.
 - 188 Giglione C, Boularot A, Meinnel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 1455–1474.
 - 189 Tadolini B. Iron autoxidation in Mops and Hepes buffers. *Free Radic Res Commun* 1987; **4**: 149–160.
 - 190 Tadolini B, Sechi AM. Iron oxidation in Mops buffer. Effect of phosphorus containing compounds. *Free Radic Res Commun* 1987; **4**: 161–172.
 - 191 Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.

- Nat Protoc* 2006; **1**: 2876–2890.
- 192 Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2527–2535.
 - 193 Grant RA, Filman DJ, Finkel SE, Kolter R, Hogle JM. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol* 1998; **5**: 294–303.
 - 194 Kajiwarra K, Hiragi Y. Structure analysis by small-angle X-ray scattering. In: Saisho H, Gohshi Y (eds). *Applications of synchrotron radiation to materials analysis*. Elsevier Science, 1996, pp 353–404.
 - 195 Barinov NA, Prokhorov V V, Dubrovin E V, Klinov D V. AFM visualization at a single-molecule level of denaturated states of proteins on graphite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016; **146**: 777–784.
 - 196 Chiang Y-L, Chang Y-C, Chiang I-C, Mak H-M, Hwang I-S, Shih Y-L. Atomic force microscopy characterization of protein fibrils formed by the amyloidogenic region of the bacterial protein MinE on mica and a supported lipid bilayer. *PLoS One* 2015; **10**: e0142506.
 - 197 Sharma S, Grintsevich EE, Phillips ML, Reisler E, Gimzewski JK. Atomic force microscopy reveals drebrin induced remodeling of F-actin with subnanometer resolution. *Nano Lett* 2011; **11**: 825–827.
 - 198 Jayawardena N, Kaur M, Nair S, Malmstrom J, Goldstone D, Negron L *et al*. Amyloid fibrils from hemoglobin. *Biomolecules* 2017; **7**: E37.
 - 199 Hou C, Li J, Zhao L, Zhang W, Luo Q, Dong Z *et al*. Construction of protein nanowires through cucurbit[8]uril-based highly specific host-guest interactions: an approach to the assembly of functional proteins. *Angew Chemie Int Ed* 2013; **52**: 5590–5593.
 - 200 Ghatak P, Karmakar K, Kasetty S, Chatterji D. Unveiling the role of Dps in the organization of mycobacterial nucleoid. *PLoS One* 2011; **6**: e16019.

Anexo I – Sistema de sobreexpressão

I.1. Genótipo das células de expressão *E. coli* BL21(DE3) (NZYTech)

F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

I.2. Mapa do vector de expressão pET-21c(+) com o gene que codifica para a proteína DpsT10C

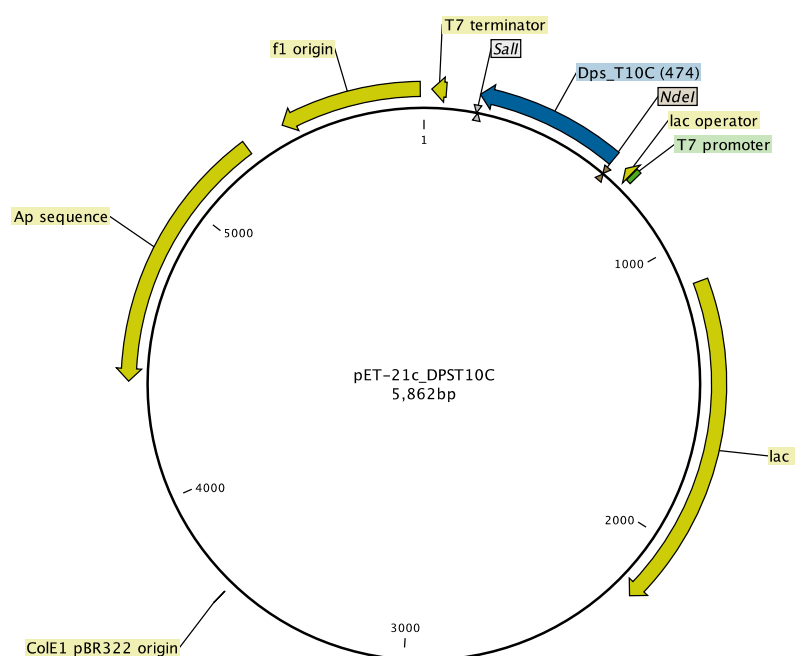


Figura I.1 – Mapa do vector de expressão pET-21c(+)-DpsT10C, disponibilizado por Daniela Penas, do grupo de Biofísica Molecular, UCIBIO/Requimte, FCT NOVA.

I.3. Sequência de aminoácidos da proteína mutante DpsT10C

MGKNFIGLDC	DKTQKLADAL	NELLSNYQIF	YMNVRGYHWN	IKGDNFFELH	AKFEELYDDL
LLKIDEIAER	VLTLGHRPAH	AYSTYIEKSE	VPERKDVSDG	KEAVGNIVES	FGKLIKQRG
LLNLAGEAED	EGTVALMSDY	ISQQEKTVM	YRSYLGQ		

Anexo II - Marcadores de massas moleculares para electroforese em gel de poliacrilamida

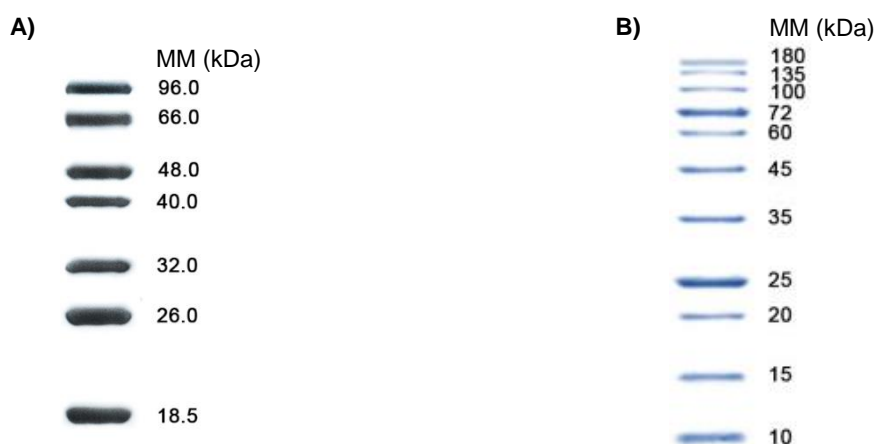


Figura II.1 – Marcadores de massas moleculares de proteínas utilizados ao longo do presente trabalho. **A)** *Low Molecular Weight* (NZYTech). **B)** NZYBlue (NZYTech). Os valores das massas moleculares, MM, das proteínas em cada banda encontram-se apresentados em kDa. As imagens **A)** e **B)** não estão apresentadas à escala entre si.

Anexo III – Electroforese em gel de poliacrilamida

Soluções utilizadas:

- Solução I: Tris-HCl 1,25 M pH = 8,8 – 9,0;
- Solução II: Tris-HCl 0,50 M pH = 6,6 – 6,8;
- Tampão de separação para SDS-PAGE: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% p/v, pH = 8,3;
- Tampão de separação para PAGE: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH = 8,3;
- Tampão de amostras com β -mercaptoetanol: Tris-HCl 0,125 M pH = 6,6 – 6,8, SDS 4% p/v, β -mercaptoetanol 5% v/v, glicerol 10% v/v, azul bromofenol 0,02% p/v;
- Nota: os tampões de amostras sem β -mercaptoetanol e sem SDS foram preparados não adicionando os componentes referidos.

Tabela III.1 – Volumes de soluções e reagentes utilizados na preparação de géis de poliacrilamida para SDS-PAGE e PAGE.

		Gel de empacotamento	Gel de resolução	
		5	12,5	15
	Acrilamida (%)			
Volume de solução ou reagente (mL)	Solução I	-	1,5	1,5
	Solução II	0,9	-	-
	Acrilamida-bisacrilamida 30:0,8	0,6	4,16	5
	SDS 10%^a	0,036	0,1	0,1
	Água	1,88	4,2	3,32
	PSA 10%	0,027	0,076	0,076
	TEMED	0,004	0,005	0,005

^a Nos casos em que se pretendeu preparar um gel para PAGE, o volume de SDS foi substituído por água.

Anexo IV – Montagem para as reacções de acoplamento

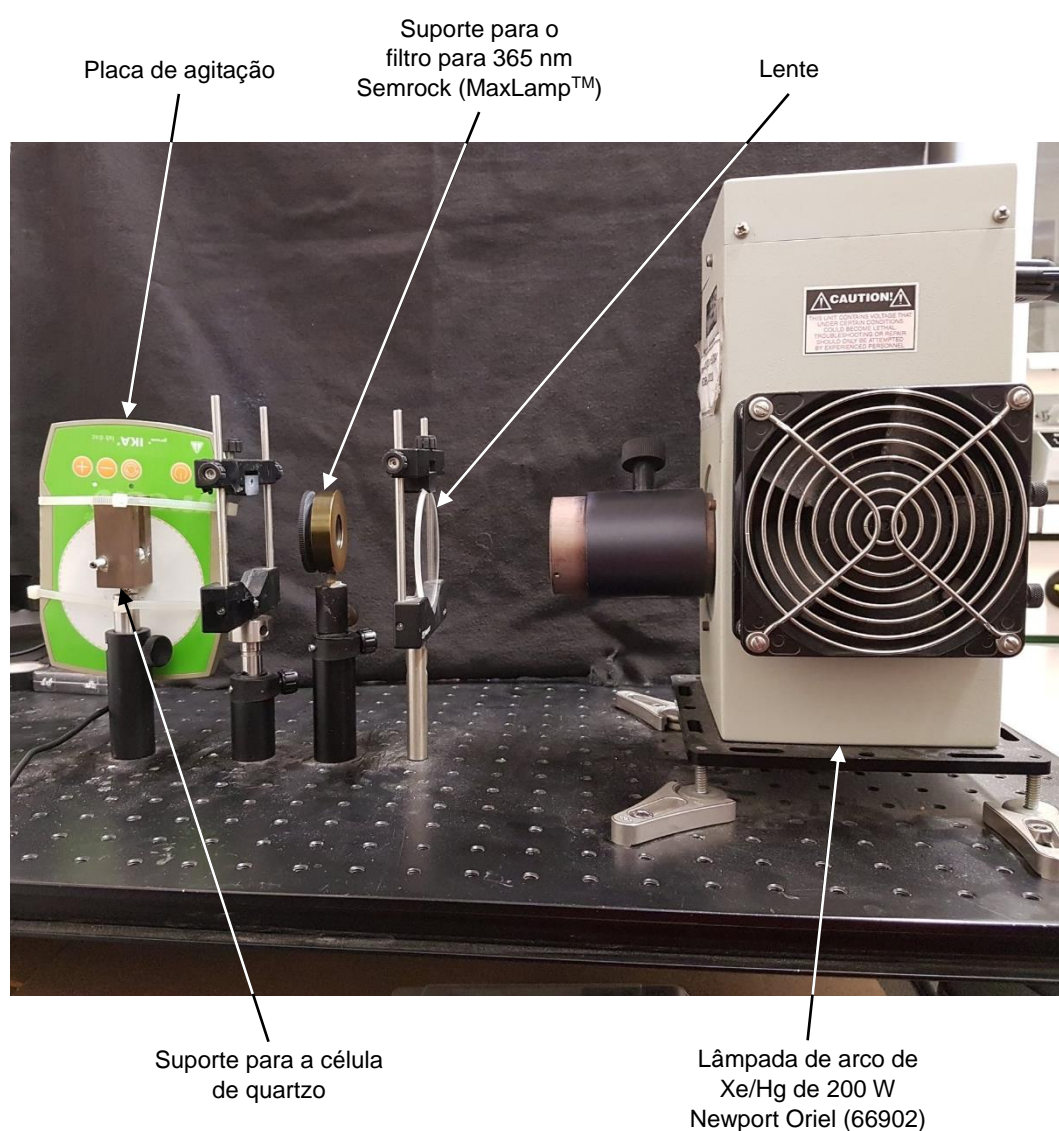


Figura IV.1 – Montagem utilizada nas reacções de acoplamento, com indicação do equipamento.

Anexo V – Quantificação densitométrica das bandas dos géis de SDS-PAGE

As análises das imagens digitais dos géis SDS-PAGE dos produtos das várias reacções de funcionalização e de acoplamento, foram realizadas com recurso ao programa informático Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*)¹⁵²⁻¹⁵⁴. Após se abrir a imagem desejada, alinharam-se individualmente todos os perfiz electróforéticos das amostras aplicadas no gel, segundo uma linha segmentada, seguindo-se a sequência de ferramentas e menus *Segmented Line>Edit>Selection>Straighten...* Posteriormente, ajustou-se a largura da linha para 125 píxéis com *Image>Adjust>Line Width...* e rodou-se 90° a imagem obtida correndo-se *Image>Transform>Rotate 90 Degrees Right*. Tendo-se alinhado todos os perfiz de separação pretendidos, criou-se uma imagem única com todos e guardou-se. Por fim, seleccionou-se uma secção rectangular, em cada amostra, desde cerca do meio do gel de empacotamento até depois da última banda e englobando as várias bandas; traçou-se o perfil de intensidade de cada amostra ao longo da secção; traçou-se uma linha de base nas várias bandas do gel e mediu-se a área por baixo da curva correspondente a cada banda, utilizando a seguinte macro:

[illegible]

```

run("Select Next Lane");
waitForUser("Select Next Lane", "Select Next Lane")
//setTool("line");
run("Plot Lanes");
//setTool("line");
title = "WaitForUserDemo";
msg = "Seleccionar baseline \"makeLine\" then click \"OK\".";
waitForUser(title, msg);

setTool("Wand");
title = "WaitForUserDemo";
msg = "Seleccionar area then click \"OK\".";
waitForUser(title, msg);

```

Aplicou-se a macro apresentada em triplicado à imagem única gerada com todos os perfis electroréticos alinhados e, com os valores das áreas obtidos, estimou-se a percentagem média de proteína existente em cada banda (Tabelas V.1 a V.4).

A percentagem de subunidades ligadas por pontes dissulfureto (PD), para cada proteína, foi determinada segundo a Equação V.1. Por sua vez, a percentagem de subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (\overline{PD}) foi calculada pela Equação V.2, se o produto pretendido for das reacções de preparação de **24** ou de **29** a **33**. Caso se tenha utilizado algum bioconjugado **24** para originar o produto da reacção de acoplamento em causa, determinou-se \overline{PD} pela Equação V.3. Nas situações em que se obteve um valor de \overline{PD} negativo, considerou-se este zero. As estimativas das percentagens de subunidades ligadas encontram-se apresentadas nas Tabelas V.1 a V.4.

$$PD = D_{-\beta} - D_{+\beta} \quad \text{Equação V.1}$$

$$\overline{PD} = D_{+\beta} - D_{23+\beta} \quad \text{Equação V.2}$$

$$\overline{PD}_{\text{acoplamento de 23 e 24}} = D_{+\beta} - D_{23+\beta} - \frac{D_{24+\beta}}{2} \quad \text{Equação V.3}$$

onde $D_{-\beta}$ representa a estimativa da percentagem de dímeros existentes na ausência de β -mercaptoetanol; $D_{+\beta}$, a estimativa da percentagem de dímeros existentes na presença de β -mercaptoetanol; e $D_{23+\beta}$ $D_{24+\beta}$, a estimativa da percentagem de dímeros existentes na presença de β -mercaptoetanol, respectivamente, nas proteínas **23** e **24**.

Tabela V.1 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização **24a** a **24c** e de acoplamento **26a** a **26c**.

Gel	Proteína	Poço	Monómeros (%)	Dímeros (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
Figura 3.10 – A	23	1	92	8	7	a
		4	99	1		
	24a	2	96	4	3	0
		5	99	1		
	26a	3	81	19	8	9
		6	90	10		
Figura 3.10 – B	23	1	90	10	8	a
		4	98	2		
	24b	2	94	6	4	0
		5	98	2		
	26b	3	75	25	9	14
		6	84	16		
Figura 3.10 – C	23	2	89	11	11	a
		6	99	1		
	24c	3	98	2	2	0
		7	99	1		
	26c	4	76	24	10	13
		8	86	14		

^a não aplicável

Tabela V.2 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização **24e** e **24f** e de acoplamento **27a** a **27c**.

Gel	Proteína	Poço	Monómeros (%)	Dímeros (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
Figura 3.11 – A	24e	1	74	26	13	12
		4	87	13		
	23	2	80	20	19	a
		5	99	1		
	27a	3	72	28	13	9
		6	85	15		
Figura 3.11 – C	24e	1	86	14	6	7
		4	92	8		
	23	2	88	12	11	a
		5	99	1		
	27b	3	71	29	18	7
		6	89	11		
Figura 3.11 – E	24f	1	81	19	10	8
		4	91	9		
	23	2	85	15	13	a
		5	98	2		
	27c	3	71	29	17	6
		6	89	11		

^a não aplicável

Tabela V.3 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos das reacções de funcionalização **24g** e **24h** e de acoplamento **28**.

Gel	Proteína	Poço	Monómeros (%)	Dímeros (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
Figura 3.12 – A	24g	1	92	6	3	3
		2	97	3		
Figura 3.12 – B	24h	1	92	8	5	3
		4	97	3		
	23	2	82	18	18	a
		5	100	-		
	28	3	66	34	23	10
		6	89	11		

^a não aplicável

Tabela V.4 – Estimativa da percentagem média de proteína existente nas bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros de subunidades nos géis SDS-PAGE dos produtos da reacção de acoplamento **29** a **33**.

Gel	Proteína	Poço	Monómeros (%)	Dímeros (%)	Subunidades ligadas por pontes dissulfureto (%)	Subunidades ligadas que não por pontes dissulfureto (%)
Figura 3.13 – A	23	1	84	16	15	a
		3	98	2		
	29	2	58	42	23	18
		4	80	20		
Figura 3.14 – A	23	1	69	31	31	a
		4	100	-		
	30	2	40	60	54	5
		5	95	5		
	31	3	40	60	53	7
		6	93	7		
Figura 3.14 – C	23	1	66	34	34	a
		5	100	-		
	32	2	27	73	70	3
		6	97	3		
	33.S	3	78	22	3	19
		7	81	19		
	33.P	4	70	30	0	32
		8	68	32		

^a não aplicável

Anexo VI – Quantificação de grupos sulfidrilo

VI.1. Síntese de *N*-acetil-*S*-alil-*L*-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)

VI.1.1. Método I

A solução padrão de **17** a 2,9 mM foi preparada com 9,1 mg de **17** e 21 μL de HCl concentrado para um volume final de 25 mL. O tampão utilizado para as quantificações dos grupos sulfidrilo foi KPB 100 mM pH = 8,0, NaCl 100 mM e não se acrescentou DMF.

Os valores de absorvância medidos a partir dos padrões e das várias amostras encontram-se indicados nas Tabelas VI.1 e VI.2, respectivamente, assim como os dados necessários à realização da recta de calibração (Figura VI.1) e ao cálculo do número médio de grupos sulfidrilo por molécula e o resultado deste último.

Tabela VI.1 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,024	0,024	0
		0,024		
2	8,74	0,151	0,150	0,126
		0,150		
3	14,6	0,230	0,229	0,205
		0,228		
4	21,9	0,327	0,330	0,306
		0,333		
5	29,1	0,436	0,448	0,424
		0,461		
6	36,4	0,532	0,536	0,512
		0,540		

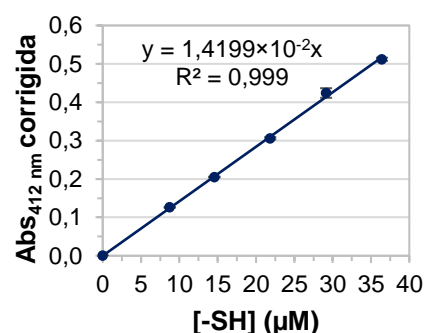


Figura VI.1 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.

Tabela VI.2 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método I.^a

Derivado de 19 ou controlo	Tempo reaccional ^b (min)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [19]	Grupos reagidos (%)
-	0	0,257	0,260	0,236	0,707	0
		0,260				
		0,262				
20a	10	0,024	0,024	0	0	100
		0,024				
		0,025				
	20	0,024	0,024	0	0	100
		0,024				
		0,024				

Derivado de 19 ou controlo	Tempo reaccional ^b (min)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[19]}$	Grupos reagidos (%)
20b	10	0,192	0,192	0,168	0,508	28,2
		0,194				
		0,191				
	20	0,171	0,175	0,151	0,457	35,4
		0,178				
		0,176				
	30	0,164	0,166	0,142	0,429	39,3
		0,167				
		0,168				
	60	0,147	0,147	0,123	0,372	47,4
		0,138				
		0,156				
	120	0,135	0,143	0,119	0,360	49,1
		0,147				
		0,146				
	15 h 45 min	0,030	0,029	0,005	0,0151	97,9
		0,027				
		0,029				
20c	10	0,025	0,025	0,001	0,00302	99,6
		0,026				
		0,025				
	20	0,024	0,024	0	0	100
		0,025				
		0,024				
C1	-	0,025	0,025	0,001	-	-
		0,026				
		0,024				
C2	-	0,025	0,025	0,001	-	-
		0,026				
		0,025				
C3	-	0,025	0,024	0	-	-
		0,024				
		0,024				

^a As quantificações foram realizadas com 30 µL de mistura reaccional.

^b Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

VI.1.2. Método II

Para este método de síntese não foi realizada nenhuma recta de calibração, o tampão utilizado para as quantificações dos grupos sulfidrilo foi KPB 100 mM pH = 8,0, NaCl 100 mM e também não se acrescentou DMF. Os valores de absorvância lidos foram corrigidos subtraindo-se o valor médio do padrão 1 do método I (Tabela VI.1) e multiplicando-se pelos factores de diluição resultante da adição do reagente alifático bromado e da preparação das amostras para a quantificação. A percentagem de grupos sulfidrilo reagidos foi determinada a partir dos valores de absorvância corrigidos.

Na Tabela VI.3, encontram-se indicados os valores de absorvância medidos a partir das várias amostras, assim como os dados necessários ao cálculo da percentagem de grupos sulfidrilo reagidos.

Tabela VI.3 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo nas reacções de síntese pelo método II.^a

Derivado de 19	Tempo reaccional ^b (min)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida (para o volume reaccional)	Grupos reagidos (%)
20a	0	0,405	-	381	0
	10	0,027	-	3,02	99,2
	20	0,036	-	12,1	96,8
	30	0,030	-	6,03	98,4
	60	0,025	-	1,01	99,7
	75	0,029	0,029	0,168	100
		0,030			
		0,029			
	130	0,033	0,033	0,302	99,9
		0,034			
		0,031			
20b	0	0,306	-	282	-
	10	0,423	-	402	-
	20	0,457	-	436	0
	30	0,385	-	363	16,6
	60	0,415	-	393	9,70
	90	0,379	-	357	18,0
	130	0,360	-	338	22,4
	439	0,298	-	276	36,7
	22 h 56 min	0,292	-	270	38,1
	26 h 18 min	0,277	-	255	41,6
	5 d 1 h 36 min	0,122	-	98,6	77,3
20c	0	0,360	-	336	0
	10	0,193	-	170	49,4
	20	0,108	-	84,6	74,8
	30	0,081	-	57,4	82,9
	60	0,041	-	17,1	94,9
	90	0,034	-	10,1	97,0
	130	0,030	-	6,04	98,2

^a As quantificações foram realizadas com 1 µL de mistura reaccional, excepto a $t = 75$ min e a $t = 130$ min na reacção de síntese de **20a** que se utilizou 30 µL.

^b Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

VI.2.Funcionalização de DpsT10C (24a a 24h)

Uma vez que as reacções de funcionalização de **23** foram realizadas em dias diferentes e se variou o sal do tampão e a concentração do reagente alquilante em DMF, preparou-se uma recta de calibração e uma solução padrão de L-cisteína diferente para cada reacção. Os dados referentes à solução padrão de **17**, assim como o sal do tampão utilizado e o volume de DMF empregue nas quantificações dos grupos sulfidrilo, encontram-se indicados na Tabela VI.4.

Tabela VI.4 – Dados para a preparação da solução padrão de L-cisteína (**17**) ~1 mM, sal do tampão e quantidade de DMF utilizados na construção das rectas de calibração e nas quantificações dos grupos sulfidrilo realizadas nas reacções de formação dos bioconjugados de **23** (**24a** a **24h**).

Bioconjugado de 23		24a	24b	24c	24d	24e	24f	24g	24h
Solução padrão de 17	c (mM)	0,990	0,969	0,989	0,981	0,977	0,973	0,977	
	m (mg)	3,1	24,2	24,7	24,5	24,4	24,3	24,4	
	V _{HCl} concentrado (μL)	7	56		56			56	
	V _{final} da solução (mL)	25	200		200			200	
Sal do tampão		NaCl			NaCl	KI		NaCl	KI
Volume de DMF (μL)		48			48	5		48	

Os dados necessários para a construção de cada recta de calibração e as rectas obtidas encontram-se apresentados nas Tabelas VI.5, VI.7, VI.9, VI.11, VI.13, VI.15, VI.17, VI.19 e Figuras VI.2 a VI.9, respectivamente. Por sua vez, os dados necessários às determinações do número médio de grupos sulfidrilo por proteína e os valores obtidos, para os vários bioconjugados de **23**, estão indicados nas Tabelas VI.6, VI.8, VI.10, VI.12, VI.14, VI.16, VI.18 e VI.20. Em cada quantificação foram tomados 30 μL da mistura reaccional.

Tabela VI.5 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24a**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,024	0,025	0
		0,026		
2	1,99	0,053	0,052	0,027
		0,051		
3	3,97	0,074	0,074	0,049
		0,073		
4	5,96	0,100	0,100	0,075
		0,099		
5	7,94	0,126	0,126	0,101
		0,126		
6	9,93	0,153	0,152	0,127
		0,150		
7	14,9	0,217	0,218	0,193
		0,219		
8	22,3	0,307	0,309	0,284
		0,311		
9	29,8	0,405	0,405	0,380
		0,405		

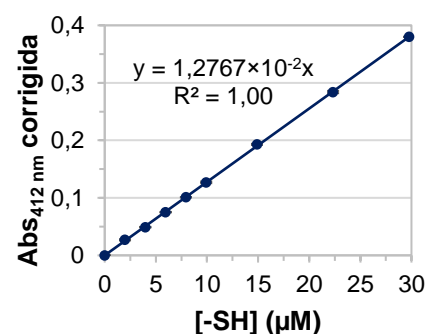


Figura VI.2 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24a**.

Tabela VI.6 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24a**.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-\text{SH}]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	31,4	0,152	0,156	0,131	10,9	0
		0,167				
		0,149				
15	15,5	0,032	0,033	0,008	1,35	87,6
		0,033				
		0,033				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.7 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24b**.

Padrão	$[-\text{SH}]$ (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,022	0,022	0
		0,023		
2	1,94	0,048	0,050	0,028
		0,053		
3	3,87	0,075	0,078	0,056
		0,080		
4	5,81	0,102	0,102	0,080
		0,102		
5	7,75	0,124	0,127	0,105
		0,13		
6	9,69	0,153	0,152	0,130
		0,151		
7	14,5	0,215	0,218	0,196
		0,220		
8	21,8	0,312	0,314	0,292
		0,315		
9	29,0	0,405	0,405	0,383
		0,405		

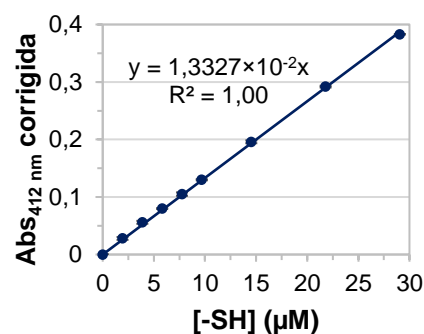


Figura VI.3 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24b**.

Tabela VI.8 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24b**.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-\text{SH}]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	31,4	0,137	0,136	0,114	9,08	0
		0,137				
		0,135				
15	15,5	0,029	0,029	0,007	1,13	87,6
		0,028				
		0,029				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.9 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,024	0,024	0
		0,025		
2	1,98	0,058	0,054	0,030
		0,051		
3	3,95	0,077	0,076	0,052
		0,075		
4	5,93	0,103	0,102	0,078
		0,101		
5	7,91	0,127	0,128	0,104
		0,129		
6	9,89	0,154	0,154	0,130
		0,154		
7	14,8	0,218	0,218	0,194
		0,217		
8	22,2	0,318	0,316	0,292
		0,315		
9	29,7	0,409	0,410	0,386
		0,411		

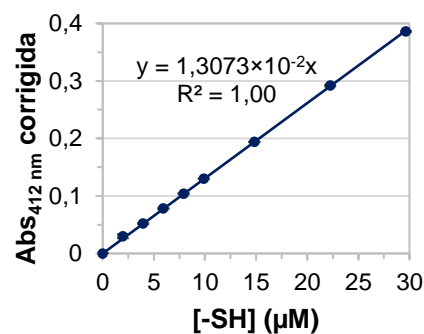


Figura VI.4 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c.

Tabela VI.10 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24c.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	31,4	0,153	0,152	0,128	10,4	0
		0,153				
		0,151				
15	15,5	0,033	0,034	0,010	1,65	84,2
		0,034				
		0,034				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.11 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24d**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,026	0,027	0
		0,028		
2	1,96	0,054	0,052	0,025
		0,051		
3	3,92	0,075	0,075	0,048
		0,075		
4	5,88	0,105	0,102	0,075
		0,100		
5	7,85	0,125	0,125	0,098
		0,125		
6	9,81	0,109	0,109	0,082
		0,150		
7	14,7	0,216	0,216	0,189
		0,215		
8	22,1	0,312	0,312	0,285
		0,312		
9	29,4	0,410	0,406	0,379
		0,403		

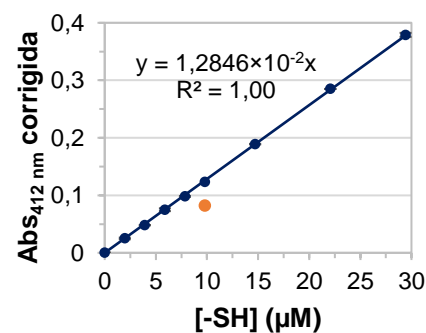


Figura VI.5 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24d**. O ponto a cor-de-laranja foi despretado.

Tabela VI.12 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24d**.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	15,7	0,083	0,083	0,056	9,26	0
		0,084				
		0,083				
10	15,5	0,081	0,081	0,054	9,04	2,33
		0,081				
		0,082				
20	15,5	0,080	0,082	0,055	9,21	0,518
		0,082				
		0,083				
40	15,5	0,081	0,081	0,054	9,04	2,33
		0,081				
		0,081				
135	13,8	0,063	0,063	0,036	6,77	26,9
		0,063				
		0,063				
195	13,8	0,061	0,061	0,034	6,39	30,9
		0,062				
		0,060				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.13 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24e**.

Padrão	[–SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,023	0,024	0
		0,024		
2	1,95	0,044	0,044	0,020
		0,044		
3	3,91	0,067	0,068	0,044
		0,068		
4	5,86	0,084	0,084	0,060
		0,084		
5	7,81	0,113	0,112	0,088
		0,112		
6	9,77	0,136	0,135	0,111
		0,134		
7	14,7	0,197	0,196	0,172
		0,195		
8	22,0	0,288	0,289	0,265
		0,290		
9	29,3	0,379	0,380	0,356
		0,380		

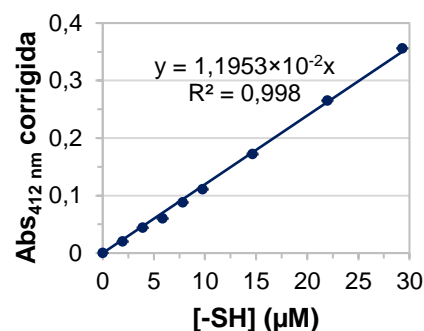


Figura VI.6 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24e**.

Tabela VI.14 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24e**.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	15,7	0,083	0,086	0,062	11,0	0
		0,086				
		0,089				
10	15,3	0,048	0,048	0,024	4,37	60,3
		0,048				
		0,047				
20	15,3	0,033	0,034	0,010	1,82	83,4
		0,035				
		0,033				
30	15,3	0,031	0,031	0,007	1,28	88,4
		0,031				
		0,032				
40	15,3	0,029	0,029	0,005	0,911	91,7
		0,030				
		0,029				
50	15,3	0,029	0,029	0,005	0,911	91,7
		0,029				
		0,029				
60	15,3	0,028	0,028	0,004	0,729	93,4
		0,028				
		0,029				
85	15,3	0,027	0,027	0,003	0,547	95,0
		0,027				
		0,028				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.15 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,030	0,029	0
		0,028		
2	1,95	0,051	0,052	0,023
		0,052		
3	3,89	0,076	0,076	0,047
		0,076		
4	5,84	0,101	0,102	0,073
		0,102		
5	7,78	0,124	0,124	0,095
		0,123		
6	9,73	0,151	0,150	0,121
		0,149		
7	14,6	0,212	0,212	0,183
		0,213		
8	21,9	0,307	0,308	0,279
		0,309		
9	29,2	0,397	0,400	0,371
		0,404		

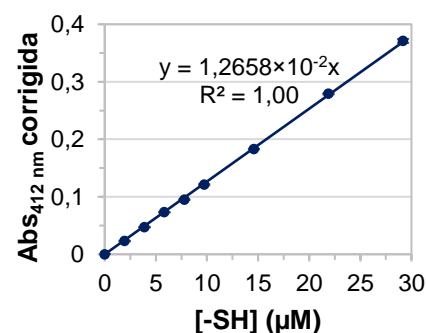


Figura VI.7 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f.

Tabela VI.16 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24f.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0	15,7	0,087	0,087	0,058	9,73	0
		0,087				
		0,087				
10	15,3	0,054	0,054	0,019	3,27	66,4
		0,053				
20	15,3	0,039	0,044	0,003	0,516	94,7
		0,050				
30	15,3	0,043	0,042	0,007	1,20	87,6
		0,041				
40	15,3	0,031	0,033	0,004	0,688	92,9
		0,035				
50	15,3	0,030	0,032	0 ^b	0	100
		0,033				
60	15,3	0,029	0,028	0 ^b	0	100
		0,028				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

^b Uma vez que se obteve um valor negativo, muito próximo de zero, no cálculo de Abs_{412 nm} corrigida, considerou-se o valor zero.

Tabela VI.17 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24g**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,021	0,020	0
		0,019		
2	1,95	0,045	0,046	0,026
		0,046		
3	3,91	0,070	0,069	0,049
		0,068		
4	5,86	0,091	0,090	0,070
		0,089		
5	7,81	0,112	0,113	0,093
		0,114		
6	9,77	0,133	0,134	0,114
		0,134		
7	14,7	0,230	0,210	0,190
		0,190		
8	22,0	0,259	0,260	0,240
		0,260		
9	29,3	0,332	0,332	0,312
		0,333		

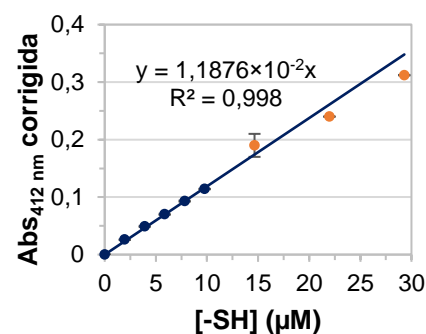


Figura VI.8 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24g**. Os pontos a cor-de-laranja foram desprezados.

Tabela VI.18 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado **24g**.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0	15,7	0,091	0,089	0,069	12,3	0
		0,086				
		0,090				
10	15,5	0,077	0,073	0,053	9,60	22,2
		0,072				
		0,069				
20	15,5	0,050	0,053	0,033	5,98	51,6
		0,059				
		0,051				
30	15,5	0,046	0,048	0,028	5,07	58,9
		0,048				
		0,049				
40	15,5	0,039	0,040	0,020	3,62	70,6
		0,039				
		0,042				
50	15,5	0,039	0,041	0,021	3,80	69,2
		0,041				
		0,044				
60	15,5	0,038	0,039	0,019	3,44	72,1
		0,039				
		0,040				
90	15,5	0,038	0,038	0,018	3,26	73,6
		0,039				
		0,037				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.19 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,022	0,022	0
		0,021		
2	1,95	0,034	0,034	0,012
		0,035		
3	3,91	0,050	0,052	0,030
		0,054		
4	5,86	0,075	0,068	0,046
		0,061		
5	7,81	0,086	0,086	0,064
		0,087		
6	9,77	0,102	0,096	0,074
		0,091		
7	14,7	0,131	0,134	0,112
		0,136		
8	22,0	0,203	0,199	0,177
		0,195		
9	29,3	0,274	0,250	0,228
		0,226		

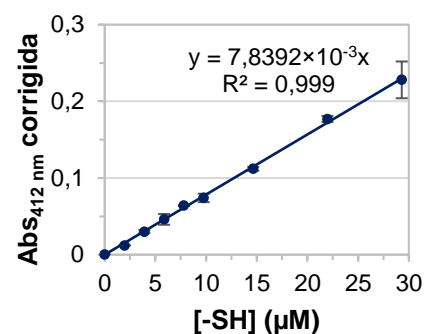


Figura VI.9 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h.

Tabela VI.20 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na preparação do bioconjugado 24h.

Tempo reaccional ^a (min)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0	15,7	0,073	0,072	0,050	13,5	0
		0,073				
		0,069				
10	15,5	0,064	0,059	0,037	10,2	25,0
		0,054				
		0,059				
20	15,5	0,042	0,039	0,017	4,66	65,6
		0,038				
		0,038				
30	15,5	0,043	0,039	0,017	4,66	65,6
		0,035				
		0,038				
40	15,5	0,037	0,036	0,014	3,84	71,6
		0,036				
		0,036				
50	15,5	0,042	0,036	0,014	3,84	71,6
		0,033				
		0,034				
60	15,5	0,042	0,039	0,017	4,66	65,6
		0,034				
		0,042				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

VI.3.Acoplamento de DpsT10C (23) e DpsT10C funcionalizada (24)

No caso das reacções de acoplamento de **23** e de **24**, também se preparou uma recta de calibração e uma solução padrão de **17** diferente para cada reacção, encontrando-se os dados relativos à solução padrão, o sal do tampão e o volume de DMF utilizados apresentados na Tabela VI.21.

Tabela VI.21 – Dados para a preparação da solução padrão de L-cisteína (**17**) ~1 mM, sal do tampão e quantidade de DMF utilizados na construção das rectas de calibração e nas quantificações dos grupos sulfidrilo realizadas nas reacções de formação dos produtos de acoplamento **26a** a **33**.

Produto		26a	26b	26c	27a	27b	27c	28	29	30	31	32	33
Solução padrão de 17	c (mM)	0,973	0,977	0,969	0,977	0,969	0,977	0,977	0,973	0,981	0,985	0,969	0,981
	m (mg)	24,3	24,4	24,2	24,4	24,2	24,4	24,4	24,3	24,5	24,6	24,2	24,5
	V _{HCl} concentrado (μL)	56			56			56	56				
	V _{final} da solução (mL)	200			200			200	200				
Sal do tampão		NaCl			NaCl		KI	NaCl	NaCl				
Volume de DMF (μL)		-			-		-	-	1	-	1	-	-

A informação necessária para a construção das várias rectas de calibração encontra-se indicada nas Tabelas VI.22, VI.24, VI. 26, VI.28, VI.30, VI.32, VI.34, VI.36, VI.38, VI.40 e VI.42, enquanto as respectivas rectas estão apresentadas nas Figuras VI.10 a VI.20. Os dados necessários para a determinação do número médio de grupos sulfidrilo por proteína **23** (desprezaram-se os grupos provenientes dos produtos das reacções de funcionalização) e os valores obtidos, para os vários produtos de acoplamento **26a** a **33**, estão indicados nas Tabelas VI.23, VI.25, VI.27, VI.29, VI.31, VI.33, VI.35, VI.37, VI.39, VI.41 e VI.43.

Tabela VI.22 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidril no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento **26a**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,027	0,026	0
		0,025		
2	1,95	0,054	0,054	0,028
		0,053		
3	3,89	0,080	0,078	0,052
		0,076		
4	5,84	0,105	0,105	0,079
		0,104		
5	7,78	0,129	0,130	0,104
		0,131		
6	9,73	0,161	0,162	0,136
		0,162		
7	14,6	0,224	0,226	0,200
		0,227		
8	21,9	0,323	0,322	0,296
		0,320		
9	29,2	0,404	0,394	0,360
		0,384		

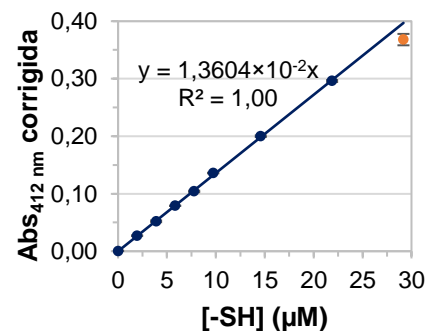


Figura VI.10 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidril no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento **26a**. O ponto a cor-de-laranja foi desprezado.

Tabela VI.23 – Dados das quantificações dos grupos sulfidril no controlo C4 e na formação do produto de acoplamento **26a**.

Produto ou controlo	Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
C4	0	15	-	0,026	0,026	0	-	-
				0,026				
				0,026				
	30	15	-	0,027	0,027	0,001	-	-
				0,026				
				0,027				
	60	15	-	0,023	0,026	0	-	-
				0,027				
				0,027				
26a	0'	15	83,5	0,186	0,190	0,164	9,62	0
				0,188				
				0,195				
	0	15	83,3	0,314	0,313	0,287	16,9	-
				0,313				
				0,373				
	30	15	83,3	0,170	0,164	0,138	8,12	15,7
				0,159				
				0,127				
	60	15	83,3	0,127	0,126	0,101	-	-
				0,130				
				0,122				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidril.

Tabela VI.24 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26b**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,025	0,026	0
		0,026		
2	1,95	0,053	0,052	0,026
		0,052		
3	3,91	0,077	0,078	0,052
		0,079		
4	5,86	0,106	0,106	0,080
		0,107		
5	7,81	0,132	0,132	0,106
		0,132		
6	9,77	0,159	0,159	0,133
		0,159		
7	14,7	0,223	0,223	0,197
		0,223		
8	22,0	0,319	0,319	0,293
		0,319		
9	29,3	0,413	0,416	0,390
		0,418		

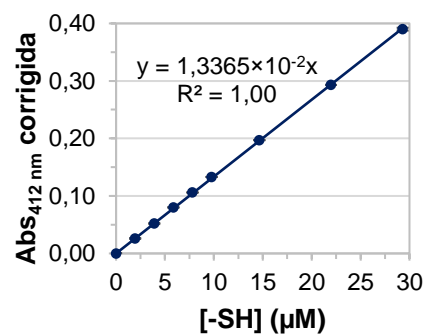


Figura VI.11 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26b**.

Tabela VI.25 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26b**.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	15	83,5	0,184	0,183	0,157	9,38	-
			0,183				
			0,182				
0	15	83,3	0,190	0,188	0,162	9,70	0
			0,190				
			0,185				
30	15	83,3	0,136	0,138	0,112	6,71	30,9
			0,139				
			0,138				
60	15	83,3	0,129	0,131	0,105	6,29	35,2
			0,131				
			0,132				
120	15	83,3	0,126	0,126	0,100	5,99	38,3
			0,125				
			0,126				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.26 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26c**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,026	0,026	0
		0,025		
2	1,94	0,053	0,053	0,027
		0,053		
3	3,87	0,080	0,082	0,056
		0,083		
4	5,81	0,107	0,108	0,082
		0,109		
5	7,75	0,132	0,132	0,106
		0,131		
6	9,69	0,162	0,162	0,136
		0,161		
7	14,5	0,224	0,228	0,202
		0,233		
8	21,8	0,326	0,336	0,310
		0,347		
9	29,1	0,419	0,420	0,394
		0,420		

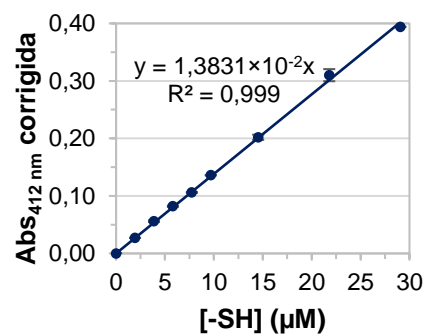


Figura VI.12 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26c**.

Tabela VI.27 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **26c**.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	15	83,5	0,211	0,203	0,177	10,2	-
			0,210				
			0,188				
0	15	94,1	0,234	0,221	0,195	9,99	0
			0,230				
			0,200				
30	15	94,1	0,192	0,194	0,168	8,61	13,8
			0,194				
			0,197				
60	15	84,4	0,156	0,156	0,130	7,42	25,7
			0,157				
			0,156				
120	15	73,9	0,115	0,115	0,089	5,80	41,9
			0,114				
			0,116				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.28 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,025	0,026	0
		0,027		
2	1,95	0,050	0,049	0,023
		0,048		
3	3,91	0,071	0,072	0,046
		0,072		
4	5,86	0,095	0,096	0,070
		0,098		
5	7,81	0,123	0,122	0,096
		0,121		
6	9,77	0,148	0,146	0,120
		0,144		
7	14,7	0,202	0,201	0,175
		0,200		
8	22,0	0,299	0,310	0,284
		0,321		
9	29,3	0,391	0,404	0,378
		0,417		

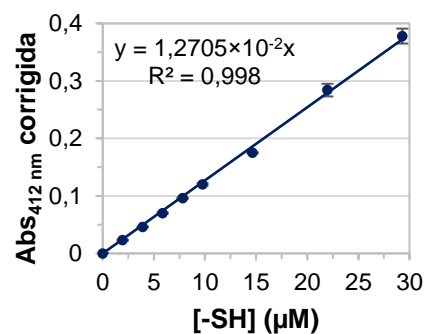


Figura VI.13 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a.

Tabela VI.29 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27a.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	15	83,3	0,204	0,208	0,182	11,5	-
			0,210				
			0,209				
0	15	83,3	0,216	0,207	0,181	11,4	0
			0,206				
			0,198				
30	15	83,3	0,162	0,156	0,130	8,19	28,2
			0,152				
			0,153				
60	15	83,3	0,142	0,145	0,119	7,50	34,3
			0,146				
			0,146				
120	15	83,3	0,149	0,148	0,122	7,69	32,6
			0,149				
			0,147				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.30 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **27b**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,027	0,028	0
		0,029		
2	1,94	0,053	0,052	0,024
		0,052		
3	3,87	0,079	0,078	0,05
		0,078		
4	5,81	0,105	0,105	0,077
		0,105		
5	7,75	0,131	0,133	0,105
		0,135		
6	9,69	0,159	0,158	0,13
		0,157		
7	14,5	0,221	0,220	0,192
		0,218		
8	21,8	0,318	0,318	0,29
		0,319		
9	29,1	0,420	0,418	0,39
		0,415		

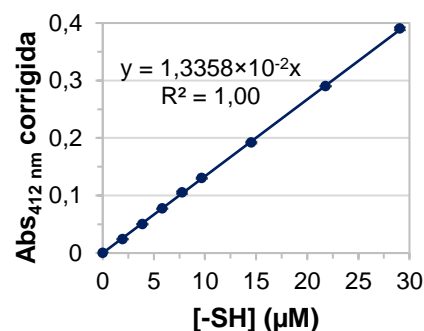


Figura VI.14 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **27b**.

Tabela VI.31 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento **27b**.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	$\frac{[-SH]}{[23]}$	Grupos reagidos (%)
0'	15	83,3	0,210	0,203	0,175	10,5	0
			0,205				
			0,194				
30	15	95,7	0,161	0,164	0,136	7,09	32,4
			0,166				
60	15	85,9	0,108	0,111	0,083	4,82	54,0
			0,114				
120	15	73,8	0,389	0,342	0,314	21,2 ^b	-
			0,296				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

^b Valor resultante da formação de partículas insolúveis que interferiram no método de quantificação.

Tabela VI.32 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,025	0,027	0
		0,029		
2	1,95	0,046	0,045	0,018
		0,044		
3	3,91	0,064	0,066	0,039
		0,068		
4	5,86	0,086	0,086	0,059
		0,087		
5	7,81	0,116	0,116	0,089
		0,115		
6	9,77	0,133	0,134	0,107
		0,136		
7	14,7	0,192	0,190	0,163
		0,187		
8	22,0	0,276	0,276	0,249
		0,276		
9	29,3	0,358	0,359	0,332
		0,360		

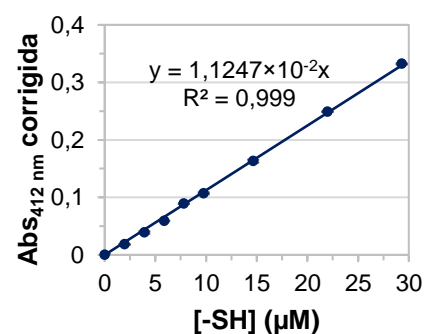


Figura VI.15 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c.

Tabela VI.33 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 27c.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	15	103,9	0,255	0,257	0,230	13,1	0
			0,258				
			0,257				
30	15	96,1	0,073	0,088	0,061	3,76	71,3
			0,102				
60	15	88,3	0,036	0,051	0,024	1,61	87,7
			0,066				
90	15	80,7	0,049	0,064	0,037	2,72	79,3
			0,078				
120	15	73,3	0,058	0,070	0,043	3,48	73,5
			0,082				
180	15	66,2	0,310	0,310	0,283	25,3 ^b	

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

^b Valor resultante da formação de partículas insolúveis que interferiram no método de quantificação.

Tabela VI.34 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,024 0,021	0,022	0
2	1,95	0,044 0,050	0,047	0,025
3	3,91	0,072 0,071	0,072	0,050
4	5,86	0,095 0,097	0,096	0,074
5	7,81	0,117 0,120	0,118	0,096
6	9,77	0,145 0,144	0,144	0,122
7	14,7	0,204 0,203	0,204	0,182
8	22,0	0,289 0,290	0,290	0,268
9	29,3	0,372 0,375	0,374	0,352

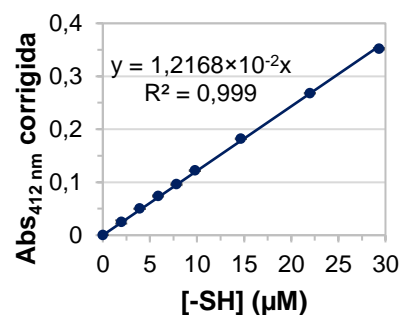


Figura VI.16 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28.

Tabela VI.35 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 28.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	10	166,6	0,245 0,246 0,245	0,245	0,223	11,0	0
30	10	184,1	0,234 0,231	0,232	0,210	9,37	14,8
60	10	170,6	0,191 0,188	0,190	0,168	8,09	26,4
120	10	158,0	0,160 0,154	0,157	0,135	7,02	36,2

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.36 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,021 0,020	0,020	0
2	1,95	0,047 0,040	0,044	0,024
3	3,89	0,058 0,067	0,062	0,042
4	5,84	0,090 0,092	0,091	0,071
5	7,78	0,119 0,123	0,121	0,101
6	9,73	0,147 0,151	0,149	0,129
7	14,6	0,206 0,210	0,208	0,188
8	21,9	0,301 0,296	0,298	0,278
9	29,2	0,405 0,398	0,402	0,382

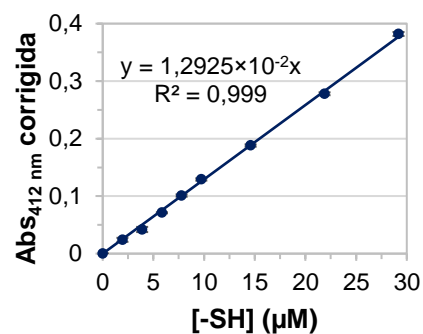


Figura VI.17 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29.

Tabela VI.37 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 29.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	10	167,2	0,187 0,184 0,185	0,185	0,165	7,64	0
30	10	225,6	0,152 0,150	0,151	0,131	4,49	41,2
60	10	188,5	0,096 0,098	0,097	0,077	3,16	58,6
120	10	159,5	0,079 0,080	0,080	0,060	2,91	61,9

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.38 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento **30** e **33**.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,021	0,022	0
		0,024		
2	1,96	0,046	0,044	0,022
		0,043		
3	3,92	0,069	0,070	0,048
		0,070		
4	5,88	0,096	0,096	0,074
		0,095		
5	7,85	0,122	0,121	0,099
		0,120		
6	9,81	0,137	0,138	0,116
		0,139		
7	14,7	0,191	0,194	0,172
		0,198		
8	22,1	0,273	0,288	0,266
		0,302		
9	29,4	0,393	0,396	0,374
		0,399		

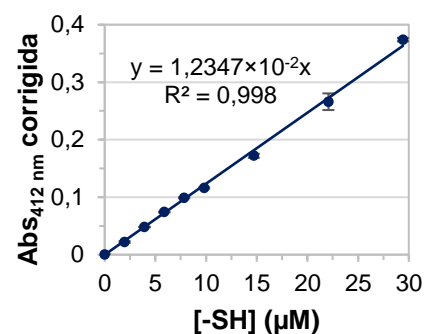


Figura VI.18 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento **30** e **33**.

Tabela VI.39 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação dos produtos de acoplamento **30** e **33**.

Controlo	Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
30	0'	10	167,1	0,210	0,205	0,183	8,87	0
				0,204				
				0,200				
	30	10	223,8	0,259	0,256	0,234	8,47	4,53
				0,254				
	60	10	188,0	0,220	0,219	0,197	8,49	4,32
				0,218				
	120	10	159,8	0,190	0,190	0,168	8,51	4,00
				0,190				
33	0'	10	166,9	0,239	0,225	0,203	9,85	0
				0,234				
				0,203				
	30	10	223,6	0,209	0,208	0,186	6,74	31,6
				0,208				
	60	10	187,9	0,139	0,135	0,113	4,87	50,6
				0,131				
	120	10	159,7	0,099	0,099	0,077	3,91	60,4
				0,099				

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.40 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,027 0,031	0,029	0
2	1,97	0,043 0,042	0,042	0,013
3	3,94	0,057 0,063	0,060	0,031
4	5,91	0,079 0,074	0,076	0,047
5	7,88	0,093 0,101	0,097	0,068
6	9,85	0,119 0,113	0,116	0,087
7	14,8	0,172 0,176	0,174	0,145
8	22,2	0,254 0,253	0,254	0,225
9	29,5	0,330 0,328	0,329	0,300

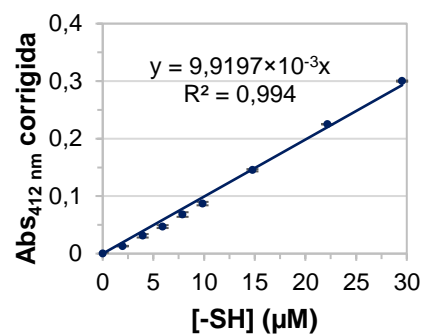


Figura VI.19 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31.

Tabela VI.41 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrilo na formação do produto de acoplamento 31.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	10	166,6	0,248 0,244 0,240	0,244	0,215	13,0	0
30	10	223,7	0,300 0,305	0,303	0,274	12,3	5,09
60	10	187,9	0,274 0,268	0,271	0,242	13,0	0,201
120	10	159,7	0,232 0,221	0,226	0,197	12,4	4,41

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrilo.

Tabela VI.42 – Construção da recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrido na formação do produto de acoplamento 32.

Padrão	[-SH] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida
1	0,00	0,021 0,020	0,020	0
2	1,94	0,046 0,045	0,046	0,026
3	3,87	0,069 0,073	0,071	0,051
4	5,81	0,095 0,097	0,096	0,076
5	7,75	0,122 0,123	0,122	0,102
6	9,69	0,148 0,151	0,150	0,130
7	14,5	0,213 0,215	0,214	0,194
8	21,8	0,306 0,306	0,306	0,286
9	29,1	0,405 0,401	0,403	0,383

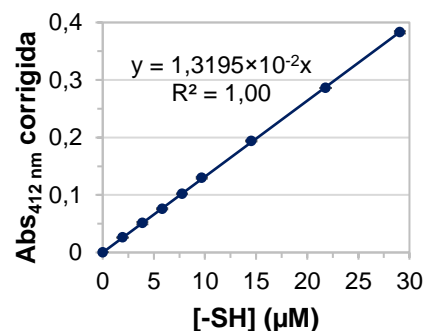


Figura VI.20 – Recta de calibração para a quantificação dos grupos sulfidrido na formação do produto de acoplamento 32.

Tabela VI.43 – Dados das quantificações dos grupos sulfidrido na formação do produto de acoplamento 32.

Tempo reaccional ^a (min)	V _{amostra} (μL)	[23] (μM)	Abs _{412 nm}	Abs _{412 nm} média	Abs _{412 nm} corrigida	[-SH] [23]	Grupos reagidos (%)
0'	10	167,1	0,240 0,235 0,240	0,238	0,218	9,89	0
30	10	223,6	0,294 0,287	0,290	0,270	9,15	7,44
60	10	187,9	0,247 0,231	0,239	0,219	8,83	10,7
120	10	159,7	0,202 0,205	0,204	0,184	8,73	11,7

^a Tempo reaccional em que se procedeu à quantificação dos grupos sulfidrido.

Anexo VII – Espectros de IV

VII.1. Material de partida das reacções de síntese de *N*-acetil-*S*-alil-L-cisteinato de etilo e compostos relacionados (20a a 20d)

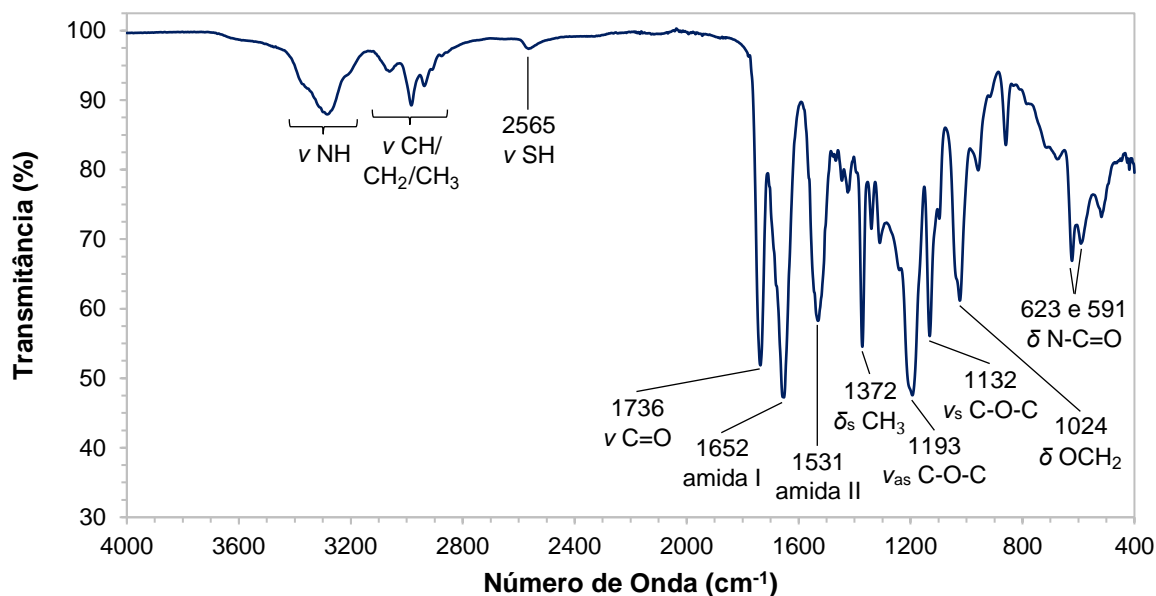


Figura VII.1 – Espectro de IV, entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹, de *N*-acetil-L-cisteinato de etilo (**19**) com a indicação das bandas e as vibrações correspondentes.

VII.2. Material de partida da reacção de síntese de *S*-(but-3-en-1-il)-L-cisteína (21a e 21b)

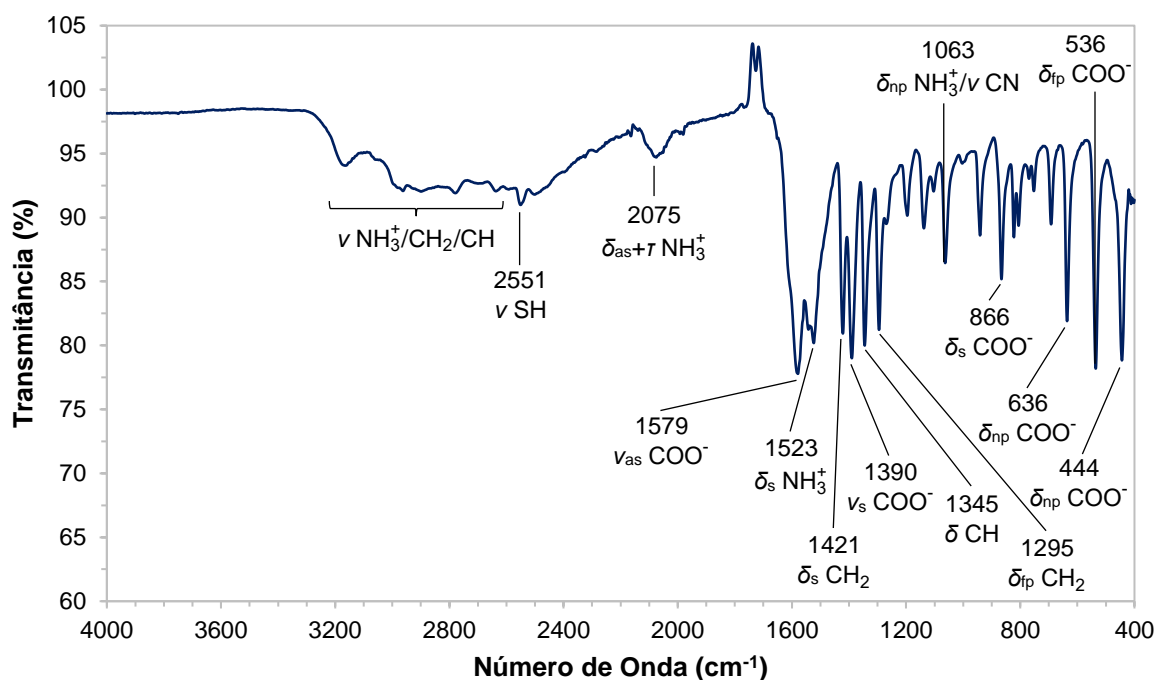


Figura VII.2 – Espectro de IV, entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹, de L-cisteína (**17**) com a indicação das bandas e as vibrações correspondentes.

Anexo VIII – Espectros de UV-Vis

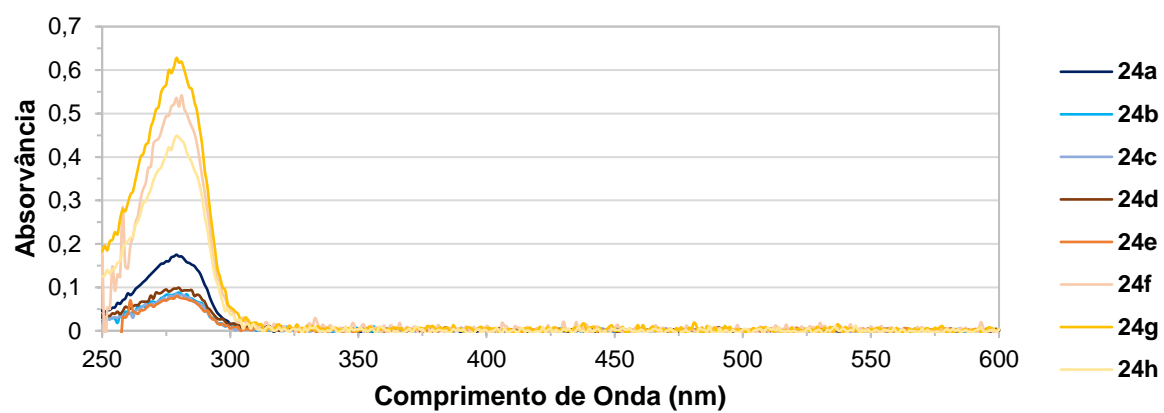


Figura VIII.1 – Espectros de UV-Vis, entre 250 nm e 600 nm, dos bioconjugados de DpsT10C 24a a 24h diluídos entre 1:10 e 1:100.